Phytochemische Untersuchungen einiger Inhaltsstoffe von GRATIOLA OFFICINALIS L. und ihre Prüfung am isolierten Meerschweinchenherzen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

des

Fachbereichs Pharmazie und Lebensmittelchemie

der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von

ALFRED MÜLLER

aus Wetzlar/Lahn

Marburg 1979

Druck: Mauersberger, Marburg

Phytochemische Untersuchungen einiger Inhaltsstoffe von GRATIOLA OFFICINALIS L. und ihre Prüfung am isolierten Meerschweinchenherzen

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von

ALFRED MÜLLER
aus Wetzlar/Lahn

Marburg 1979

Druck: Mauersberger, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Vom Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

als Dissertation angenommen am: 7.2.1979
Tag der mündlichen Prüfung: 6.2.1979
Berichterstatter: Prof. Dr. M. Wichtl
Mitberichterstatter: Prof. Dr. J. Hölzl

Die vorliegende Arbeit entstand am
Institut für Pharmazeutische Biologie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn
unter Leitung von

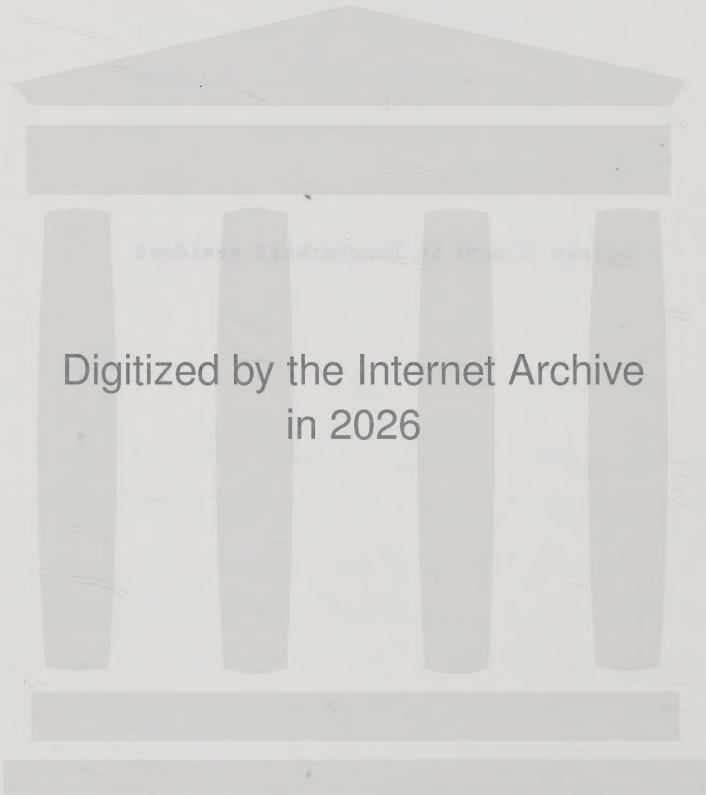
Herrn Prof. Dr. M. Wichtl,

dem ich für Anregungen und Diskussionen
sowie seine stets wohlwollende Förderung
herzlich danke.

Herrn Gartenmeister G. Pabst danke ich für den Anbau
und die gärtnerische Betreuung des Pflanzenmaterials.

Mein Dank gilt auch den Herren H. Frös, G. Seidel und
H. Vollmer für die sorgfältige und geschickte Mitarbeit
bei der Durchführung der quantitativen Bestimmungen und
der pharmakologischen Prüfungen sowie der Erstellung
der Abbildungen.

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546027_0025

Inhaltsübersicht

		Seite
1.	Einleitung und Problemstellung	1
2.	Herkunft und Kultur des Untersuchungsmaterials	15
3.	Beobachtungen zur Morphologie und Anatomie	18
4.	Untersuchung der Inhaltsstoffe	39
4.1.	Qualitative Analyse mit den üblichen phytochemischen Methoden	39
4.2.	Untersuchungen zur Frage des Vorkommens von Cardenoliden	43
4.3.	Die triterpenoiden Inhaltsstoffe	55
4.3.1.	Einführung	55
4.3.2.	Chromatographie und Isolierung von Cucurbitacin-Derivaten	57
4.3.3.	Identifizierung und Charakterisierung neuer Cucurbitacin-Glucoside	71
4.3.4.	Zur Konstitution des Gratiotoxins	87
4.4.	Andere Inhaltsstoffe	90
4.5.	Diskussion der in Abschnitt 4 erhaltenen Ergebnisse	98
5.	Quantitative Bestimmungsmethoden	100
5.1.	Problemstellung	100
5.2.	Quantitative Bestimmung der Cucurbitacine durch Remissions-Messung	101
5.3.	Indirekte spektralphotometrische Bestimmung von Gratiosid	108

Seite

6. Untersuchungen zur Biosynthese der Cucurbitacine 112

6.1. Problemstellung 112

6.2. Qualitative und quantitative Untersuchungen über den Cucurbitacin-Gehalt im Verlauf der Vegetationsperiode 113

6.3. Untersuchungen zur Aktivität der Elaterase in Abhängigkeit vom Entwicklungszustand 121

6.4. Die Triterpenoide in aus Gewebekulturen regenerierten Gratiola-Sprossen 131

6.5. Diskussion der in Abschnitt 6 erhaltenen Ergebnisse 133

7. Pharmakologische Untersuchungen zur Frage der Herzwirksamkeit von Gratiola 136

7.1. Problemstellung 136

7.2. Ergebnisse der Prüfungen am isolierten Meerschweinchen-Herz 140

7.3. Diskussion der in Abschnitt 7 erhaltenen Ergebnisse 155

8. Zusammenfassung der Ergebnisse 161

9. Experimenteller Teil 169

9.1. Ernte und Konservierung des Untersuchungsmaterials 169

9.2. Methoden der qualitativen phytochemischen Analyse 170

9.3. Allgemeine Methoden zur Isolierung und Identifizierung von Verbindungen in den Extrakten 171

9.3.1. Aufarbeitung und Extraktion des Untersuchungsmaterials 171

9.3.2. Herstellung von Trockenextrakten 174

		Seite
9.3.3.	Chromatographische Methoden	175
9.3.3.1.	Sprühreagenzien	175
9.3.3.2.	Papierchromatographie	179
9.3.3.3.	Dünnschichtchromatographie	180
9.3.3.4.	Säulenchromatographie	182
9.3.3.5.	Gaschromatographie	190
9.3.4.	Methoden der Glykosidspaltung	192
9.3.5.	Herstellung von Derivaten	193
9.3.6.	Bestimmung der physikalischen Kennzahlen	194
9.3.7.	Spektroskopische Methoden	195
9.4.	Gewinnung von Vergleichssubstanzen (Elaterinid und Desacetyl-Elaterinid)	196
9.5.	Analyse einzelner Säulenfraktionen	199
9.5.1.	"Glykosid a" (Desacetyl-Elaterinid)	199
9.5.2.	"Glykosid b" (Cucurbitacin L-Glucosid)	199
9.5.3.	"Fraktionen 93 - 104"	199
9.5.4.	"F 25"	200
9.6.	Methoden der Gehaltsbestimmung	202
9.6.1.	Probenvorbereitung	202
9.6.2.	Gesamtglykosidbestimmung mit Baljet-Reagenz	204
9.6.3.	Quantitative DC der Cucurbitacine	204
9.6.4.	Indirekte spektralphotometrische Bestimmung von Gratiosid	206
9.7.	Messung der Elaterase-Aktivität in Frischpflanzen	208
9.8.	Methoden der pharmakologischen Untersuchung	209
10.	Literaturverzeichnis	219

Häufig gebrauchte Abkürzungen und Symbole

Cuc.	Cucurbitacin-Aglykon
DC, dc	Dünnschichtchromatographie, dünnschichtchromatographisch
PC, pc	Papierchromatographie, papierchromatographisch
SC, sc	Säulenchromatographie, säulenchromatographisch
GC, gc	Gaschromatographie, gaschromatographisch
E I	Chloroform-Extrakt
E II	Chloroform-Alkohol-Extrakt
GCG	Gesamtcucurbitacingehalt (= Summe der Einzelwerte aus den Bestimmungen der Cuc. E u. I und ihrer Glucoside)
n	Anzahl der Bestimmungen
X_n	Werte der Einzelbestimmungen
Σ	Summe der Einzelwerte
$\overline{x}$	Durchschnittswert aus n Bestimmungen
X_M	Medianwert
s	(Näherungs)standardabweichung

1. Einleitung und Problemstellung

Die Gattung Gratiola aus der Familie der Scophulariaceae umfaßt etwa zwanzig Arten, die in den gemäßigten Gebieten der nördlichen und südlichen Halbkugel sowie in den Hochgebirgen der Tropen weit verbreitet sind (HEGI 1968). In Europa gab es ursprünglich neben Gratiola officinalis L. nur auf der Pyrenäen-Halbinsel eine weitere Art, G. linifolia VAHL (WILLKOMM, LANGE 1870). Daneben soll G. neglecta TORR. aus Nordamerika eingeschleppt und in der Rheinebene eingebürgert worden sein (RAUH, SENGHAS 1968). Während Gratiola officinalis, eine Staude mit kriechendem Rhizom, der phylogenetisch älteren Sektion Gratiola angehört, zählt G. neglecta zur Sektion Nibora und ist einjährig (HEGI 1968).

Gratiola officinalis L., das Gottesgnaden- oder Gnadenkraut (RAUH, SENGHAS 1968), ist in den großen Flußniederungen Europas und Asiens verbreitet, wo es auf nassen Wiesen, in Wassergräben und an Fluß- und Seeufern horstartige Verbände bildet, fehlt aber den höheren Gebirgslagen ganz (s. Abb. 1). In Deutschland selbst scheint die Art ziemlich selten geworden zu sein.

Abb. 1 : Verbreitungsgebiet von G r a t i o l a o f f i c i n a l i s (nach MADAUS 1938)

Der Name "Gratiola" (von lat. gratia = Gnade; BOERNER 1966) weist bereits auf die Bedeutung hin, die dem Gnadenkraut vor allem in der Volksmedizin früherer Zeiten beigemessen wurde. Aufschlußreich sind auch die zahlreichen volkstümlichen Namen der Droge, wobei auffällt, daß die für Herba und Rhizoma Gratiolae verwendeten Bezeichnungen (ARENDS 1971) auch für andere Drogen gebraucht werden, deren gemeinsames Merkmal der Gehalt an Bitterstoffen ist (s. nachfolgende Übersicht).

Übersicht über volkstümliche mehrdeutige Bezeichnungen für G r a t i o l a

Bezeichnung 1	Gratiola 2	Pflanzen, für die die in Spalte 1 angegebene Bezeichnung ebenfalls verwendet wurde 3
Allerheiligenkraut	Herba	
Aurin, roter		Centaurium minus MOENCH (Herba)
Aurin, weißer (wilder)	Herba	
Aurinwurzel, wilde	Rhizoma	
Aurinkraut		Centaurium minus MOENCH (Herba)
Erdgallenkraut	Herba	Fumaria officinalis L. (Herba) Anagallis arvensis L. (Herba)
Gallenkraut (-, weißes)	Herba	Menyanthes trifoliata L. (Folia) Artemisia absinthium L. (Herba)
Gallenkrautwurzel	Rhizoma	
Gichtkraut	Herba	Bellis perennis L. (Herba) Chenopodium ambrosioides L. var. anthelminticum (Herba) Geranium robertianum L. (Herba)
Gichtrebe, -rübe, -wurz		Bryonia alba L. , B. dioica JACQ. (Radix)
Gottesgnadenkraut	Herba	Centaurium minus MOENCH (Herba) Galeopsis segetum NECK. (Herba)
Gotteshilfe	Herba	Marrubium vulgare L. (Herba)
Grazede (= gratia dei)	Herba	
Heckenhyssop	Herba	
Purgierkraut	Herba	

Über die Geschichte des Gnadenkrautes als Arzneipflanze wurde bereits mehrfach in der Literatur berichtet. Es soll an dieser Stelle jedoch versucht werden, einen möglichst kurzen, aber vollständigen Überblick über die wechselvolle Geschichte dieser alten Heilpflanze zu geben, wobei ich mich im wesentlichen auf die Darstellungen von TSCHIRCH (1910) [a], KRUG (1934) [b], MADAUS (1938) [c] und SCHNEIDER (1974) [d] beziehe. Die jeweilige Quelle wird im folgenden mit [a], [b], [c] oder [d] angegeben.

Den griechischen und römischen Ärzten war die Gratiola offenbar nicht bekannt [b],[c], wenn auch verschiedentlich versucht worden ist, den "Mekon aphrodes" ("Papaver spumeum") des DIOSKURIDES mit ihr in Verbindung zu bringen [c], [d]. In Anbetracht der Tatsache, daß sich das Verbreitungsgebiet der Gratiola auch über die Mittelmeerländer erstreckt (s. Abb. 1), ist es zumindest erstaunlich, daß eine Pflanze mit solcher Heilwirkung, wie sie der Gratiola später zugeschrieben wurde, dort nicht bekannt gewesen sein soll, zumal sie so geschätzte Eigenschaften wie Bitterkeit und purgierende Wirkung aufwies.

Die erste sichere Erwähnung scheint als "gratia dei" in der "Alphita", einer Drogenliste der Salernitaner aus dem 13. Jahrhundert (Ausgabe von MOWAT 1887) [a], bzw. den 1387 von Joh. MARFELDE geschriebenen "Sinonoma Bartholomei" (Ausgabe von MOWAT 1882) [a] erfolgt zu sein.

In wieweit bei den deutschen Arzneibüchern des Mittelalters die bereits oben erwähnten synonym gebrauchten Bezeichnungen die Deutung der Pflanzennamen erschweren, vermag ich nicht zu beurteilen. Meiner Meinung nach besteht jedenfalls die Möglichkeit, daß Gratiola z.B. als Marrubium ("godesvorgetene", "helpe" im Gothaer Arzneibuch des 14. Jahrhunderts) [a] oder Centaurium ("erdgall" in KONRAD VON MEGENBERGs "Puch der Natur" von 1475) [a] fehlgedeutet werden konnte.

Im 16. Jahrhundert erwähnt VALERIUS CORDUS die Gratiola unter dem Namen "Limnesium" [c] ("Gratiola" im Dispensatorium des CORDUS von 1546, Ausgabe Antwerpen 1627) [a]. In deutschen Pharmakopöen und Taxen dieser Zeit wird "Eupatorium mesues" synonym gebraucht, später auch "Digitalis minima" [d].

Im folgenden findet man das Gnadenkraut dann auch unter dem Namen "Gratiola" abgebildet und seine Heilkraft beschrieben.

Im Gegensatz zu den Angaben von KRUG, der DODONAEUS mit "Mechliniensis medici caesarei Stirpium Historiae Pemptades sex sive libri XXX", Antwerpen 1583 [b] zitiert, hat dieser wohl bereits 1574 in seinem Werke "Purgantium aliarumque eofacientium, tum et radicum convolvulorum et deleteriarum herbarum historiae libr. IV..." Gratiola beschrieben [a].

Auch LOBELIUS ("Plantarum seu stirpium historiae", Antwerpen 1576) [b],[c] und MATTHIOLUS (New Kreuterbuch, 1626) [c] bilden die Gratiola ab und weisen auf ihre Heilkraft hin.

Diese Angaben haben wohl endgültig zur Aufnahme der Gratiola in die Materia medica geführt, wie die Erwähnung durch zahlreiche Autoren des 17. und des 18. Jahrhunderts zeigt [a),c), d)].

Verwendung findet das Gnadenkraut von nun an als starkes Abführ- und Bandwurmmittel, zur Wundheilung und gegen hartnäckige Hautleiden, ebenso gegen Hämorrhoiden. Auch als Diureticum und Gichtmittel, gegen Leber- und Gallenerkrankungen wird es empfohlen. Seltener und umstritten ist die Anwendung bei chronischer Malaria und bei Melancholie. Gelegentlich fand die Gratiola auch gegen Epilepsie, Lues und Tumoren ihre Anwendung [+)].

Weiterhin soll das Gnadenkraut starken Widerwillen gegen Tabakrauchen hervorrufen und als Abortivum wirken. Angewendet wurden zuerst nur das Kraut oder die Blätter, später auch die unterirdischen Pflanzenteile.

Heutzutage wird das Gnadenkraut wohl nur noch sehr vereinzelt in der Volksmedizin bei den oben angeführten Indikationen angewendet.

Gratiola ist im Homöopathischen Arzneibuch (1958) enthalten. Die Essenz aus dem frischen, noch nicht blühenden Kraut wird in der 2. und 3. Dezimalpotenz gegen Entzündungen der Verdauungs- und Harnorgane und gegen Nymphomanie und Melancholie angewendet.

+) KOSTRZEWSKI, Dissert. de Gratiola, Wien 1775 [c)]; "Acc. to Jac. KOSTRZEWSKI, a Polish physician" nach LEWIS, W. "An experimental history of the materia medica, 4th ed., London. Vol.1, 504 pp.; Vol.2, 495 pp. 1791", zit. nach HARTWELL (1971)).

Die getrockneten oberirdischen, zur Blütezeit gesammelten Teile waren als "Herba Gratiolae" im Ergänzungsbuch zum Deutschen Arzneibuch (Erg.-B. 6, 1938) officinell.

Eine mittlere Einzelgabe von 0,3 g der Droge als Einnahme gilt noch als unbedenklich (Erg.-B. 6). Bei höheren Dosen kommt es zu verstärktem Speichelfluß, Übelkeit, Erbrechen, Koliken, heftigen blutigen Diarrhöen, bei Schwangeren auch zum Abort. Weitere Vergiftungserscheinungen sind: bei Menstruierenden Intensivierung und Verlängerung der Blutungen (WEISS 1974), Nierenreizung bis Nierenschädigung, Brennen in den Harnwegen, manchmal auch nymphomanische Zustände; ferner Grünblindheit (SCHULZ 1907), Krämpfe, Störungen der Herztätigkeit und vor allem der Atmung. In letalen Fällen erfolgt der Tod im Kollaps, wahrscheinlich durch Atemlähmung (GESSNER, ORZECHOWSKI 1974). Eine tödliche Dosis findet sich in der Literatur nicht angegeben. Wegen der erheblichen Nebenwirkungen der Droge ist die Schulmedizin im Verlauf des 19. Jahrhunderts von der Verwendung der G r a t i o l a wieder abgekommen.

Vergleicht man die beobachteten Vergiftungserscheinungen mit denen, die durch andere einheimische Giftpflanzen hervorgerufen werden, so kann man durchaus bei Vergiftungen z.B. mit A d o n i s, C o n v a l l a r i a oder H e l l e b o r u s, also Pflanzen mit Herzglykosiden, ähnliche Symptome feststellen (LUDEWIG, LOHS 1971; GESSNER, ORZECHOWSKI 1974; BENTHE 1975).

Die Anwendung in der Volksheilkunde und die starke Giftigkeit haben schon relativ früh zu Versuchen geführt, das wirksame Prinzip der G r a t i o l a darzustellen (VAUQUELIN 1809; MARCHAND 1845; WALZ 1850, 1852; RETZLAFF 1902; MONTPELLIER 1904).

Diese Arbeiten führten zur Darstellung etlicher mehr oder weniger definierter Präparate, von denen einige in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften Ähnlichkeiten mit den Glykosiden aus D i g i t a l i s zeigten. Außer einem stark bitteren Geschmack wurden aber keine sonstigen physiologischen Wirkungen beobachtet, wohl weil keine entsprechenden Untersuchungen vorgenommen wurden.

In den dreißiger Jahren dieses Jahrhunderts war es dann vor allem der Arbeitskreis von JARETZKY, der eine ganze Reihe von Drogen auf eine Herzwirksamkeit hin überprüfte und auch bei G r a t i o l a eine cardiotoxische Wirkung am Frosch feststellte (JARETZKY 1935).

KRUG (1934) gelang die Isolierung eines Glucosides, "Gratiotoxin", das eine Wirksamkeit von 100 000 bis 200 000 Frosch-Dosen besitzen und nicht kumulieren sollte.

Man schien hier einem der Ziele der Herzglykosid-Forschung näher gekommen zu sein, das darin besteht, Substanzen zu finden, die eine größere therapeutische Breite und eine geringere Kumulation aufweisen als die "klassischen" herzwirksamen Glykoside, die ja noch immer nicht durch Synthetika ersetzt werden können (MEYER 1971; MUTSCHLER 1975).

Leider konnte KRUG (1934) das Genin des Gratiotoxins nicht identifizieren. Er fand lediglich einige positive Resultate bei den damals gebräuchlichen Farbreaktionen zur Prüfung auf Herzglykoside.

Die kritiklose Übernahme dieser Befunde war der Grund dafür, daß in zahlreichen Lehr- und Handbüchern der Drogenkunde dem Gnadenkraut eine Herzwirksamkeit im Sinne der Herzglykoside zugeschrieben wurde und wird (MADAUS 1938; BERGER 1954; BAUMGARTEN 1963; SCHAUENBERG, PARIS 1970; LUDEWIG, LOHS 1971; WILLFORT 1971; SCHMIDT-WETTER 1972; LIEBENOW, LIEBENOW 1973; FLÜCK 1974; GESSNER, ORZECHOWSKI 1974; HOPPE 1975).

Ein Vorkommen von Cardenoliden in G r a t i o l a wäre nicht nur aus pharmakologischer, sondern auch aus chemotaxonomischer Sicht für die Einteilung der S c r o p h u l a r i a c e a e von einiger Bedeutung (HEGNAUER 1970/71). Man denke dabei an die Cardenolid-haltigen Gattungen D i g i t a l i s und I s o p l e x i s sowie an P e n s t e m o n, wobei für letztere Gattung eine Bestätigung allerdings noch aussteht.

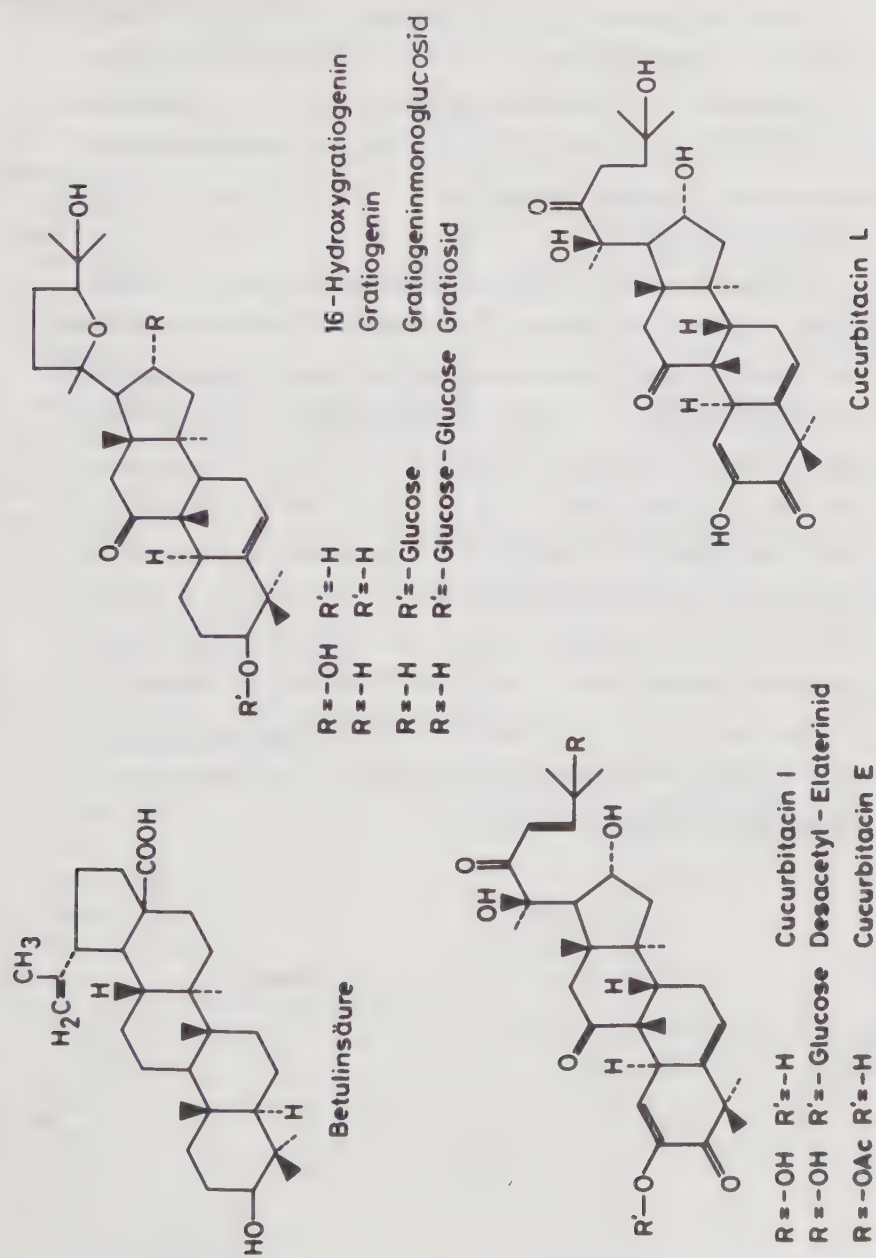
Es ist deshalb nicht verwunderlich, wenn G r a t i o l a in den letzten Jahrzehnten wiederholt pharmakologisch und phytochemisch bearbeitet wurde. Einige dieser Untersuchungen bestätigten scheinbar die Angaben von KRUG (1934). So stellte SEIFERT (1941) eine positive Reaktion bei der Prüfung der G r a t i o l a mit einem modifizierten KELLER-Test fest und BOHINC und KORBAR-SMID (1969) beobachteten nach s.c.-Injektion von G r a t i o l a -Extrakten in Froschrücken einen

systolischen Herzstillstand und verglichen die beobachtete Wirkung mit der von D i g i t a l i s p u r p u r e a L. und E r y s i m u m s y l v e s t r e (CR.) SCOP.

Demgegenüber konnten weder TSCHESCHE u. Mitarb. (1952, 1964) noch GMELIN (1967) tierexperimentell oder chemisch Herzglykoside in G r a t i o l a nachweisen. Stattdessen gelang durch diese Autoren die Identifizierung der G r a t i o l a -Bitterstoffe als Cucurbitacin-Derivate, einer Gruppe sauerstoffreicher tetrazyklischer Triterpene, die ursprünglich als familienspezifische Inhaltsstoffe der C u c u r b i t a c e a e angesehen worden waren, inzwischen (bis 1978) jedoch auch vereinzelt in anderen Familien (B r a s s i c a c e a e, S c r o p h u l a r i a c e a e, B e g o n i a c e a e, R o s a c e a e, L i l i a c e a e und P r i m u l a c e a e [+]) aufgefunden wurden.

+) Nachtrag: Y. YAMADA u. Mitarb., Phytochemistry 17, 1798 (1978).

Abb. 2: Strukturformeln der Triterpenoide aus G r a t i o l a



Diese Verbindungen, von denen einige in der Abb. 2 (S. 11) mit ihren Strukturformeln aufgeführt sind, gehören zu den C_{30}-Steroiden vom Steroid-Lanosterin-Typus, unterscheiden sich aber vom Grund-Typ beispielsweise des Lanosterins dadurch, daß 1,2-Verschiebung des C-10 Methyls zum C-Atom C-9 stattgefunden hat.

Die Cucurbitacine schmecken intensiv bitter, sie wirken lokal reizend und besitzen eine drastisch laxierende Wirkung. Sie erklären damit in mancher Hinsicht das Wirkungsspektrum des Gnadenkrautes, das damit wirkungsgemäß in enger Nachbarschaft zu gebräuchlichen Drastica wie Fructus C o l o c y n t h i d i s und Radix B r y o n i a e steht, vermögen aber nach den bisher vorliegenden Untersuchungen nicht die Hinweise auf eine Herzwirksamkeit der G r a t i o l a zu begründen. Auch die anderen bisher in G r a t i o l a aufgefundenen Inhaltsstoffe, die in der Übersicht auf Seite 13 zusammengestellt sind, erlauben keine Klärung der durch die widersprüchlichen Befunde aufgetretenen Ungewißheit über eine Herzwirksamkeit des Gnadenkrautes.

Übersicht über die bisher in G r a t i o l a o f f i c i n a l i s nachgewiesenen Inhaltsstoffe

Verbindung	Gehalt	Autor
Kohlenhydrate		
Mannit	0,22 % [1]	BORODIN, DEGOT 1970
Stachyose	-	JEREMIAS 1964
Flavonoide		
Lignosid	-	BORODIN u. Mitarb. 1970
Apigenin, Cosmosiin, Isolignosid Avrosid, Isoavrosid, Neoavrosid, Isoneoavrosid	-	LITVINENKO u. Mitarb. 1970
Triterpenoide		
Betulinsäure (= Gratiolon)	0,25 % [1]	MAURER u. Mitarb. 1939 VYSTRCIL u. " 1959
Gratiosid (= Gratiolin)	0,13 % [1]	TSCHESCHE u. Mitarb. 1952 und 1964
Gratiogeninmonoglucosid (= Gratioligenin)		
Gratiogenin		
16-Hydroxygratiogenin		
Cucurbitacin L		
Elaterinid	0,5 % [1]	GMELIN 1967 LE MEN u. Mitarb. 1969
Desacetylelaterinid	-	GMELIN 1967
Cucurbitacin E	0,08 % [2]	
Cucurbitacin I	0,02 % [2]	
Nicht identifizierte Verbindungen		
Ätherisches Öl	0,02 % [1]	KRUG 1934
Alkaloide	-	BORODIN, KURINNAYA 1970
Gratiotoxin	-	KRUG 1934

1) Bezug auf Droge
2) Frischpflanzen

Die Darstellung der Erforschung der Gratiola-Inhaltsstoffe auf den vorangegangenen Seiten erfolgte etwas ausführlicher, um die Gründe ersichtlich zu machen, die eine neuerliche Bearbeitung der Pflanze angeraten erscheinen ließen.

Zum ersten war das Ziel dieser Arbeit eine möglichst endgültige Klärung der Frage, ob in G r a t i o l a o f f i c i n a l i s L. Cardenolide vorkommen oder nicht, und bei einer Verneinung dieser Frage d i e Inhaltsstoffe herauszufinden, die für die beobachteten Herzwirkungen verantwortlich sein können.

Zum zweiten sollte versucht werden, die Analysenmethoden vor allem zur quantitativen Bestimmung der Cucurbitacine weiterzuentwickeln und Untersuchungen zur Biosynthese dieser Substanzen, die neuerdings verstärktes Interesse als Cytostatica finden, vorzunehmen; dabei ergab sich auch die Möglichkeit, Veränderungen in der Zusammensetzung der Cucurbitacine während einer Vegetationsperiode zu verfolgen.

2. Herkunft und Kultur des Untersuchungsmaterials

Zur Untersuchung der Inhaltsstoffe standen 10 kg Handelsdroge "Herba Gratiolae, Erg.-B.6, elect. conc." zur Verfügung, die im Herbst 1974 von der Fa. CAELO, Hilden/Rhld., bezogen wurden. Angaben über die Herkunft dieser Droge und über die Dauer der Lagerung liegen nicht vor. Die Identität war durch mikroskopischen Vergleich mit authentischem Material gesichert (vgl. Abschnitt 3).

Für die Untersuchungen zur Biosynthese der Cucurbitacine wurden Pflanzen, die seit über 15 Jahren im Arzneipflanzenbeet des Alten Botanischen Gartens in Marburg kultiviert wurden, im Frühjahr 1975 durch Rhizomteilung vegetativ vermehrt und im Frühsommer 1975 auf einem 15 qm großen Beet im Alten Botanischen Garten ausgepflanzt. Die vorhandene Gartenerde wurde mit Lehm und TKS 2 angereichert. Der pH-Wert des Bodens in 5 cm Tiefe beträgt 4,7[+)]. Das Beet erstreckte sich in Ost-West-Richtung und hatte vollsonnige Lage.

Über die Ansprüche des Gnadenkrautes an seinen Standort liegen erst relativ wenige Angaben vor. Nach KOSCH und AICHELE (1968) liebt die Pflanze schlammigen, etwas kalkhaltigen und dichten Boden und soll auch sommerliche Trockenheit vertragen können. Nach GARCKE (1972) besiedelt Gratiola meist mehr oder weniger staunasse und kalkhaltige, schwere Ton- und Schlammböden und ist etwas salz- und wärmeliebend.

Ein erfolgreicher Anbau ist jedenfalls ohne große Schwierigkeiten möglich, solange die Vermehrung vegetativ erfolgt. Die Pflanzen bilden dann einen dichten Bestand, der auch für eine

---

+) Glaselektrode; 10 g lufttr. Boden in 25 ml 0,1n KCl-Lösung

maschinelle Ernte gut geeignet sein dürfte. Die Verunkrautung ist gering, nur vereinzelt kommen E p i l o b i u m, E q u i s e t u m und T a r a x a c u m vor. Aus diesem Grund konnte auf die Anwendung von Herbiziden verzichtet werden. Außer einer Auflockerung des Bodens im Frühjahr und einer gelegentlichen Beregnung in Zeiten starker Trockenheit waren keine sonstigen Pflegemaßnahmen notwendig.

Der Ertrag während der Blütezeit betrug im Jahre 1977 in den Monaten Juli bis September durchschnittlich 2,2 kg Frischmasse pro Quadratmeter Anbaufläche. Bei einem durchschnittlichen Trocknungsverlust von 72 % ergibt das 0,6 kg lufttrockene Herba-Droge pro Quadratmeter (s. Tab. 1).

Allein die Vermehrung durch Samen bereitete Schwierigkeiten. Bei mehreren Versuchen in den Jahren 1975 - 1978 wurden jeweils die vom letzten Herbst stammenden Samen im Frühjahr unter verschiedenen Bedingungen ausgesät. Die Keimungsraten waren jedoch sehr gering, meist unter 10 %. In den Fällen, wo die Sämlinge im Treibhaus weiter gezogen werden konnten, kamen die Pflanzen bereits im ersten Jahr zur Blüte.

Tab. 1 : Ertrag der G r a t i o l a -Anbaufläche im Jahre 1977 (für Einzelheiten der Ernte und Konservierung s. Exp. Teil)

Ernte-Datum	Parzellen-Nr. (0,75 m^2)	Frischmasse (g)	Ertrag (kg/m^2)	Trocken-masse (g)	Trocknungs-verlust (%)
7.7.	8	1836	2,448	419	77,18
11.7.	6	1992	2,656	479	75,95
15.7.	1	1789	2,385	437	75,57
22.7.	5	1456	1,941	392	73,08
5.8.	7	1644	2,192	485	70,50
16.8.	9	1415	1,887	465	67,14
23.8.	10	1369	1,825	369	73,05
30.8.	3	1675	2,233	561	66,51
6.9.	4	1635	2,180	533	67,40
n = 9		Σ 14811	19,747	4140	646,38
		$\bar{x}$ 1645,7	2,194	460	71,82
		x_M 1644	2,192	465	73,05

Am erfolgreichsten verlief die Aussaat noch, wenn sie auf feuchtes Fließpapier o.ä. in Petrischalen erfolgte, die dann auf einer Fensterbank über einem Heizkörper gehalten wurden. Von den Anfang April ausgesäten Samen waren nach 10 Tagen etwa 10 % ausgekeimt. Nach weiteren 14 Tagen hatten die meisten Keimlinge Primärblätter und wurden dann pikiert. Leider mußten die auf diese Weise angezogenen Pflanzen im Verlauf von Pflanzenschutzmaßnahmen vernichtet werden. Insgesamt war die Menge des durch Aussaat erhaltenen Materials zu gering, so daß neben der Handelsdroge nur das vegetativ vermehrte Material zur Verfügung stand.

3. Beobachtungen zur Morphologie und Anatomie

Eine ausführliche Beschreibung der Morphologie des Gnadenkrautes (Abb. 3) findet sich bei HEGI (1968), der auch über einige Variationen in Habitus und Blütenbau berichtet.

Abb. 3 : Habitusbild einiger blühender Pflanzen vom Rand des Versuchsfeldes

Im Hinblick auf spätere Untersuchungen war es daher erforderlich, das von uns verwendete Pflanzenmaterial so genau wie möglich zu charakterisieren.

Nach HEGI (1968) gibt es unveränderliche Klone mit scharfer Grenze zwischen Unterbau und Floreszenz, und andere, in denen sich beide Regionen durchdringen. Die in Marburg angebauten Pflanzen gehören in die letztgenannte Kategorie.

Allerdings ist zu bemerken, daß der Habitus der Pflanzen entscheidend von der Dichte des Bestandes abhängt. Die Abbildungen 3 und 4 zeigen deutlich die Unterschiede in der Wuchsform, die zwischen den am Rande des Feldes stehenden Pflanzen und denen in der Mitte bestehen.

Abb. 4 : Gesamtansicht der G r a t i o l a - Anbaufläche (Ende August 1977)

Am rechten Bildrand deutlich zu sehen die Neutriebe, die etwa drei Wochen nach dem Schnitt erschienen. Bei Schnittzeiten bis Ende Juli kamen die Neutriebe noch im Herbst zur Blüte.

Weitere erblich festgelegte Variationen betreffen Abänderungen im Staubblattkreis, der in der Regel aus je zwei fertilen und sterilen Staubblättern besteht. Selten können die Staminodien ganz fehlen, öfter aber tritt ein weiteres Staminodium, meist als kurzer stiftförmiger Rest, zwischen den Basen der fertilen Staubblätter auf. Dieses Rudiment fehlte bei den von mir bearbeiteten Pflanzen.

Abgesehen von diesen erblich festgelegten Variationen kommt es noch zu einem Formwandel der Laubblätter bei untergetauchter Lebensweise (HEGI 1968).

Über die Bedeutung der morphologischen Merkmale, in Kombination mit den Inhaltsstoffen, für die systematische Stellung der Art wird im Rahmen dieser Arbeit noch zu diskutieren sein (s. unter 8.).

Abb. 5 : G r a t i o l a o f f i c i n a l i s L.
(ca. 2fache natürliche Größe)

Durch ihren Blütenbau (s. Abb. 5) ist die Pflanze eigentlich gut charakterisiert. Bei einem Vergleich der Monographien im Ergänzungsbuch (Erg. - B. 6, 1938) und verschiedenen Handbüchern der Drogenkunde (WASICKY 1936, BERGER 1954), die sich alle auf die Herba - Droge beziehen, fiel jedoch auf, daß es, vor allem über Anzahl und Form der Blütenblätter, verschiedene Auffassungen gab. Eine daraufhin von mir vorgenommene Durchmusterung einiger hundert Blüten bestätigte im wesentlichen die Beschreibung, die durch WASICKY (1936) gegeben wurde (von jeweils etwa zweihundert untersuchten Blüten zeigte eine Abweichungen, s. u.). Da aber darüberhinaus in allen Monographien diagnostisch wichtige Merkmale zum Teil nur oberflächlich oder überhaupt nicht beschrieben wurden (z.B. keine Aussage über den Spaltöffnungstyp !), erschien es mir gerechtfertigt, im Rahmen dieser Arbeit eine nach pharmakognostischen Gesichtspunkten zusammengestellte Übersicht über die morphologischen und anatomischen Merkmale von Kraut- und Wurzel-Droge anzufertigen, zumal von letzterer keine allgemein zugängliche Beschreibung existiert.

Außerdem können nicht-blühende Pflanzen nach TSCHIRCH (1925) mit *Scutellaria galericulata* L. (Sumpf-Helmkraut, Lamiaceae), *Veronica anagallis* (*V. anagalloides* GUSS., Schlamm-Ehrenpreis, oder *V. anagallis-aquatica* L., Gauchheil-Ehrenpreis ?; Scrophulariaceae) und *Lythrum salicaria* L. (Blut-Weiderich, Lythraceae) verwechselt werden, eine Gefahr, die dadurch noch vergrößert wird, daß alle diese Pflanzen im gleichen Biotop beheimatet sind.

Mit Hilfe der angegebenen anatomischen Merkmale sollte aber auch bei nicht blühenden Exemplaren eine Verfälschung erkannt werden können.

Eine eingehende mikroskopische Analyse +) der für die Untersuchungen verwendeten Handelsdroge (s. unter 2.) ergab völlige Übereinstimmung mit den in nachfolgender Übersicht zusammengestellten Charakteristika.

+) durchgeführt nach den allgemeinen Bestimmungen der geltenden Arzneibücher, bzw. den üblichen Methoden der mikroskopischen Drogen-Analyse.

Übersicht über die morphologischen und anatomischen Merkmale von G r a t i o l a o f f i c i n a l i s L.

a) Kraut

Die zur Blütezeit (Juni-Juli) geernteten oberirdischen Teile, deren Konservierung durch Trocknen bei Raumtemperatur erfolgen sollte (vgl. 6.).

Ganzdroge (Abb. 6) :

Sie besteht aus der 20 - 40 cm hohen blühenden Hauptachse, die unverzweigt oder, im unteren Teil, mit schwachen blattachselständigen Seitentrieben versehen ist.

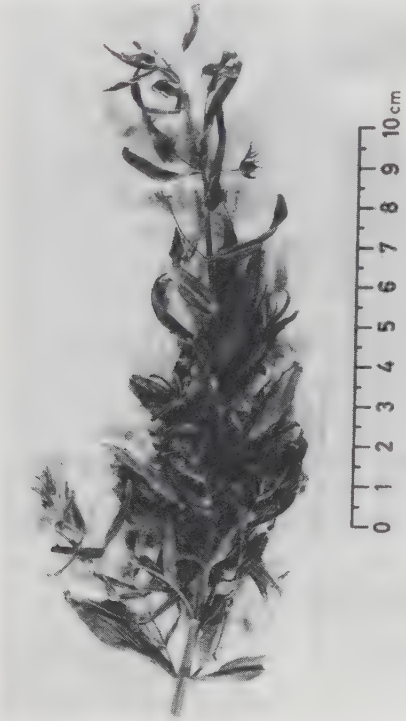


Abb. 6 : Gottesgnadenkraut (Ganzdroge)

Der Stengel, 1 - 4 mm dick, ist im unteren Teil stielrund, nach oben durch vom Blattgrund herablaufende Längsleisten vierkantig, fein längsgefurcht, innen markig oder hohl, und im unteren Teil oft rötlich-violett überlaufen.

Die bis zu 5 cm langen Blätter sind dekussiert angeordnet, sitzend und halbstengelumfassend. Die Blattspreite hat eine eiförmig längliche, bei kleineren Blättern auch lanzettliche Form. Der Blattrand, in der oberen Blatthälfte entfernt und schmal gesägt, ist in der Droge meist auf ganzer Länge nach

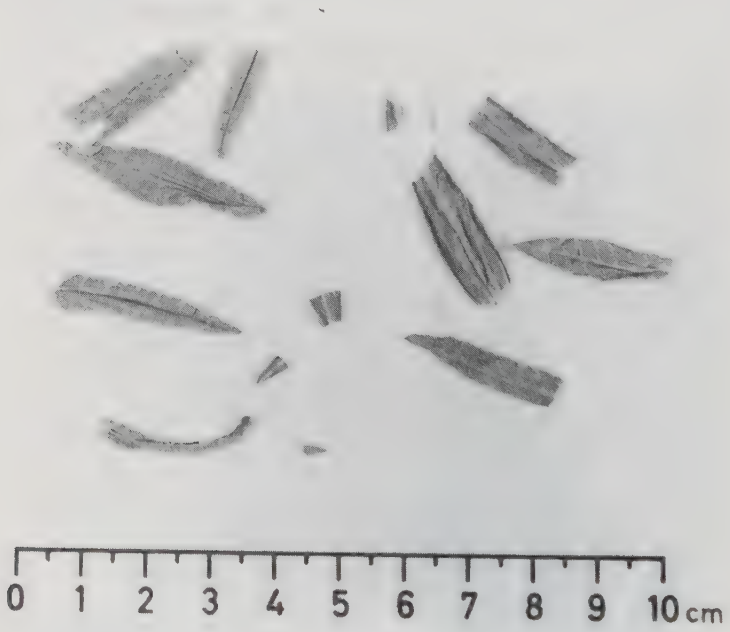


Abb. 7 : Gottesgnadenkraut (Blätter)

unten umgebogen. Die hellgrünen bis braungrünen getrockneten Blätter (s. Abb. 7) zeigen einen unterseits hervortretenden Hauptnerv und zwei oder vier nahezu parallel verlaufende Seitennerven.

Die Blüten stehen einzeln in den Blattachseln und bilden insgesamt eine lockere Traube. Am Ende des bis zu 2 cm langen, dünnen Blütenstiels findet man Blütenknospen, Blüten, oder aber schon Früchte von verschiedenem Reifegrad. Unmittelbar vor dem schwach zygomorphen Kelch befinden sich zwei schmallanzettliche Vorblätter, die in charakteristischer Weise schräg nach oben gerichtet sind. Der Kelch besteht aus fünf grünen, etwa 1 cm langen, schmalen, spitz zulaufenden Sepalen, die fast bis zum Grund getrennt sind.

Die Blüten selbst erscheinen schwach zweilippig. Sie bestehen aus der etwa 1 cm langen, vor allem oberseits gelbbraunen Kronröhre und den (in der Regel) vier Kronblättern, deren vorderer Rand in der Mitte ausgebuchtet ist. Die Oberlippe, etwa 7 mm breit, ist im Übergang zum Schlund der Kronröhre gelb behaart, ebenso die zwei seitlichen, zur Unterlippe zählenden Blütenblätter, diese aber nur in den an die Oberlippe grenzenden Teilen. Die Blütenblätter selbst sind hell violett, zur Kronröhre hin weiß, vor allem auf der Oberseite. In der Droge ist die ganze Blüte meist stark geschrumpft, von weißlicher bis braun-gelber Farbe, am Rande violett.

Die beiden seitlichen und das eine (in seltenen Fällen tief gespaltene und dann Fünfzahl vortäuschende) untere Kronblatt zeigen auf ihrer Fläche einen Haupt- und vier rötliche

Nebennerven, alle parallel zueinander verlaufend, während man auf der Oberlippe zwei Haupt- und vier bis sechs Nebenadern erkennen kann.

Der oberständige Fruchtknoten trägt an der Basis ein ringförmiges Nektarium. Der Griffel endet in einer flachen, in Aufsicht dreieckigen weißen Narbe, deren Spitze zur Unterlippe hingewendet ist. - Im Innern der Kronröhre finden sich je zwei fertile und sterile Staubblätter, letztere mit langem dünnem Filament. Zwischen den fertilen Staubblättern und parallel zu deren kurzen, fast kegelförmigen Filamenten erstreckt sich ein dichter weißer Haarfilz.

Die eventuell in der Droge vorhandenen Früchte sind spitzeiförmige, etwa 0,5 cm große, zweifächerige Kapseln, die selbst in reifem Zustand nicht vollständig aufspringen. Erst auf Druck hin öffnen sie sich vierklappig. Allerdings sind sie an der Spitze stets schon geöffnet; so können sie die sehr zahlreichen (über 100) und kleinen, ca. 0,5 mm langen, walzlichen Samen ausstreuen, die, je nach Reifegrad, schmutzig gelbgrün bis fahl braun erscheinen.

Mikroskopisches Bild

Laubblätter

Mesophyll mit zwei Reihen Palisaden und lockerem Schwammparenchym. Zellen der oberen Epidermis kutikular gestreift, mit buchtigen, derben Seitenwänden; anomocytische Spaltöffnungen (Spaltöffnungsindex um 5).

Laubblattunterseite mit wellig - buchtigen Epidermiszellen. Zahlreiche Spaltöffnungen vom R a n u n c u l a c e e n - Typ (= anomocytisch), leicht in die Epidermis eingesenkt. Spaltöffnungsindex um 25.

Auf beiden Blattseiten zahlreiche Drüsenschuppen vom L a m i a c e e n - Typ, mit eng anliegender (!) Kutikula; Durchmesser etwa 20 µm. Die Drüsenschuppen bestehen aus einer bis 10 µm großen trichterförmigen Stielzelle und bis zu 16 (!) Sekretionszellen (Aufsicht). Ätherisches Öl konnte in ihnen nicht nachgewiesen werden; sie sind also wohl eher (in Übereinstimmung mit HEGI 1968) als Trichomhydathoden anzusehen.

Auf den Nerven, deren Leitbündel frei von Fasern sind, finden sich vereinzelt Haare mit dreizelligem Stiel und einzelligem Köpfchen.

Vorblätter

Gleicher Bau wie die Laubblätter, jedoch sehr viel stärker behaart. Vorwiegend Drüsenschuppen (wie oben beschrieben) und, vor allem an den Rändern, Köpfchenhaare, bis 30 µm groß, mit zweizelligem Stiel und, entweder einzelligem birnenförmigen Köpfchen, oder das Köpfchen aus zwei kleineren, kugeligen Zellen gebildet.

Kelchblätter

Drüsenschuppen sind hier weniger häufig, dafür zahlreiche Schlauch- und Köpfchenhaare; letztere mit ein- bis zweizelligem, gedrungenem Stiel und kugeligem, einzelligem oder ver-

kehrt eiförmigem, zweizelligem Köpfchen. Außerdem bis 50 µm lange einzellige, am oberen Ende abgerundete Schlauchhaare mit glatter oder gestreifter Kutikula, sowie, vor allem an den Nerven, bis 100 µm lange, zweigliedrige Haare, ebenfalls mit kopfig abgerundetem Ende. Im Gewebe des Blattgrundes außerdem zahlreiche kleine Oxalatdrusen (Durchmesser bis 25 µm).

Blüten

Epidermiszellen der Korolle polygonal, auf den Lippen papillös. Die gelbe Schlundbehaarung besteht aus teilweise über 1000 µm langen, am oberen Ende keulenförmig erweiterten einzelligen Haaren mit grober längswarziger Kutikula. Haare aus dem Inneren der Kronröhre ebenfalls sehr lang, gewunden, aber weiß und nicht keulenförmig erweitert.

Zellen des Endotheciums spangen- bis sternförmig verdickt; Pollenkörner trikolpat, mit dünner, glatter Exine. Die Pollenkörner haben einen Durchmesser von etwa 15 bis 25 µm.

An der Basis des Fruchtknotens zahlreiche kleine Drusen, Kristallbüschel und Einzelkristalle.

Frucht

Die Zellen des Perikarps sind stark gewellt, mit stark verdickten und verholzten Wänden. Daneben kommen noch längliche Steinzellen vor.

Samen

Die Testa besteht in der Aufsicht aus stark getüpfelten, braunen Zellen, die 10 - 15 µm groß und fast rechteckig sind. Die Zellwände sind stark verdickt. Vereinzelt finden sich Öltröpfchen.

Stengel

Der Stengel zeigt im mikroskopischen Bild im wesentlichen den gleichen Aufbau wie das nachfolgend beschriebene Rhizom.

b) Rhizome und Wurzeln

Ganzdroge

Die Ganzdroge enthält Wurzelstöcke, Ausläufer und sproßbürtige Wurzeln (Abb. 8).

Die meist rötlich überlaufenen Rhizome sind bis 5 mm dick. An den Querwülsten, die sich in Abständen von einem halben Zentimeter ringförmig um die Rhizome ziehen, sind meist noch die gekreuzt-gegenständig angeordneten, schuppenförmigen braunen Niederblätter vorhanden. Seitlich oder auf der Unterseite des Rhizoms entspringen die hellen, gelb-braunen, dünnen Wurzeln, von denen vielfach nur noch die kreisrunden Abbruchstellen (Durchmesser etwa 0,5 - 1 mm) zu sehen sind.

Die mikroskopischen Aufnahmen auf den folgenden Seiten wurden von Handschnitten mit einem ORTHOMAT in Verbindung mit dem Mikroskop ORTHOLUX II (Firma LEITZ, Wetzlar) angefertigt.

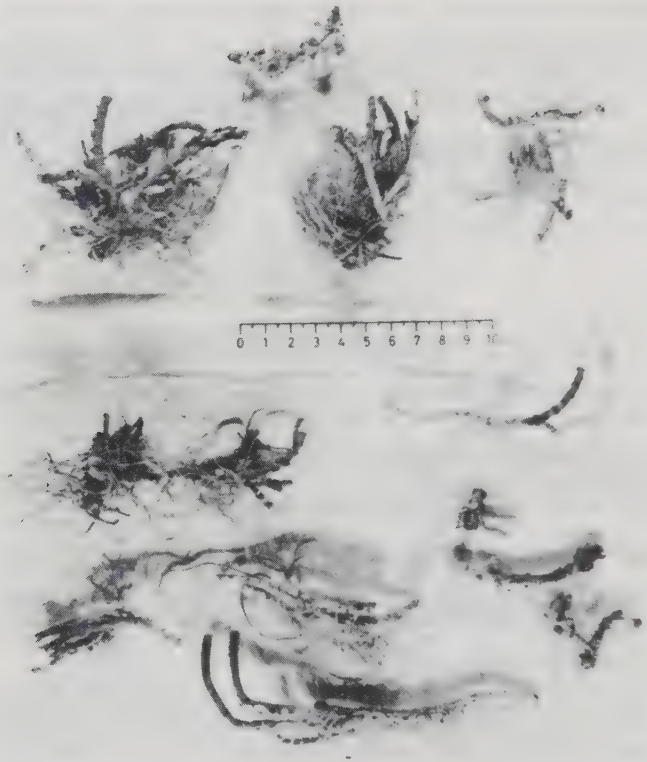


Abb. 8 : Rhizome und Wurzeln von G r a t i o l a

An der glatten Bruchstelle des Rhizoms erkennt man ein sehr lockeres weißes Rindenparenchym, einen gelblichen, ringförmigen Holzteil und ein lockeres weißes Mark. Der Bruch der Wurzel ist glatt bis körnig und weiß.

Betupft man die Bruchfläche des Rhizoms mit 70prozentiger Schwefelsäure, so färbt sich nach kurzer Zeit der Holzteil grün, während das Mark eine rötliche Färbung annimmt. Mit Eisen-III-

chloridlösung färbt sich der ganze Querschnitt sofort bläulich grün.

Die unterirdischen Teile des Gnadenkrautes sind, ebenso wie das Kraut selbst, geruchlos und schmecken bitter.

Mikroskopisches Bild

Rhizom

Die Übersicht des Querschnittes läßt vor allem ein sehr lockeres Aerenchym erkennen, das über 1000 µm breit ist (Abb. 9). Im Zentralzylinder befindet sich ein etwa 100 µm breiter geschlossener Ring von Gefäßen, die das im Verhältnis zum Rindenparenchym dichtere Mark umgeben.

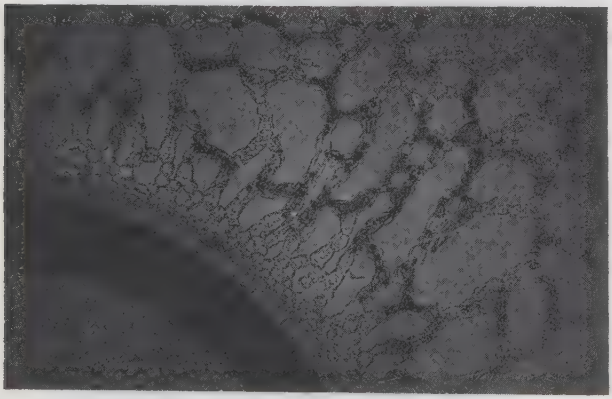


Abb. 9 : Querschnitt des Rhizoms
(Vergrößerung ca. 100fach)

Nach außen wird das Rhizom begrenzt von relativ dünnwandigen Epidermiszellen, deren äußere Wände eine gezackte verkorkte und meistens auch verholzte Auflagerung haben (Abb. 10). In Aufsicht erscheinen die oft rötlich gefärbten Epidermiszellen längsgestreckt, mit welligen Wänden und längsverlaufender kutikularer Streifung.

Nach innen folgen ein bis zwei Schichten kollenchymatischer Zellen, deren tangentiale Zellwände bis zu 15 µm dick sein können (Abb. 10).

Daran schließt das mächtige Aerenchym an mit großen, meist radial gestreckten Interzellularräumen, die zur Endodermis hin kleiner werden.

Abb. 10 : Epidermis, Kollenchym und äußerer Teil des Aerenchyms (Vergrößerung ca. 400fach)

Die Zellwände des Aerenchyms sind durch verholzte Verdickungen verstärkt, die ring- oder bandförmig um die Zellen herumlaufen (Abb. 11 und 12).

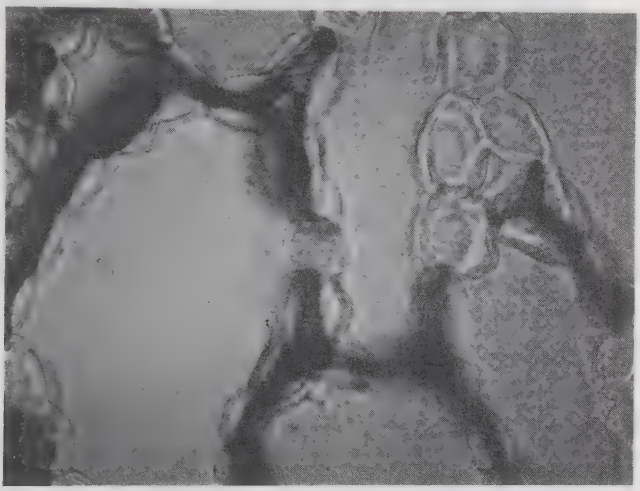


Abb. 11 : Aerenchymzellen mit verholzten Wandverstärkungen Querschnitt-Anfärbung mit Phloroglucin-Perchlorsäure-Reagens (Vergrößerung ca. 400fach)

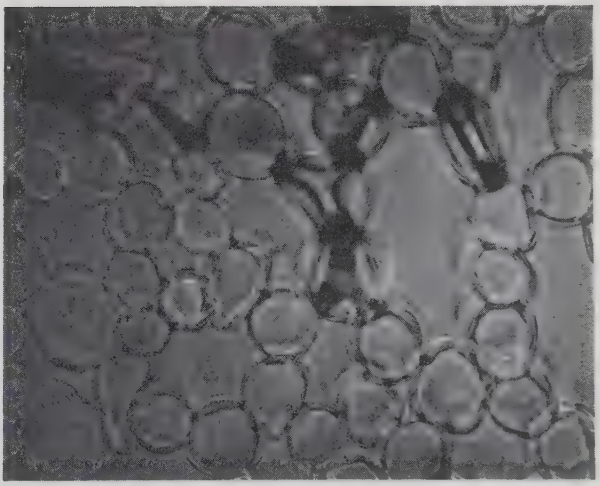


Abb. 12

Miteinander verbunden sind die Aerenchymzellen durch zahlreiche Tüpfel, die in der Aufsicht fensterartig aussehen (Abb. 13

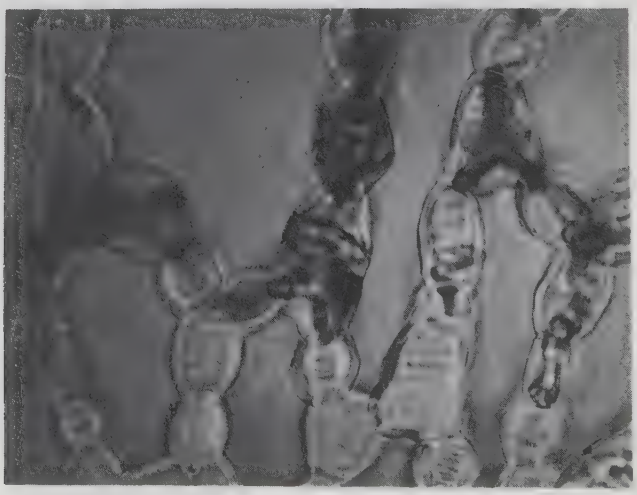


Abb. 13 : Aerenchym-Querschnitt; Anfärbung mit Phloroglucin-Perchlorsäure-Reagens (Vergrößerung ca. 400fach)

Die Art der Stützung des lockeren Gewebes wird im Längsschnitt-Präparat noch einmal gut sichtbar (Abb. 14). Man erkennt, daß die bandförmigen Verstärkungen als schichtweise Auflagerungen auf die ursprüngliche Zellwand erfolgten.

Abb. 14 : Längsschnitt durch das Aerenchym des Rhizomes (Vergrößerung ca. 400fach)

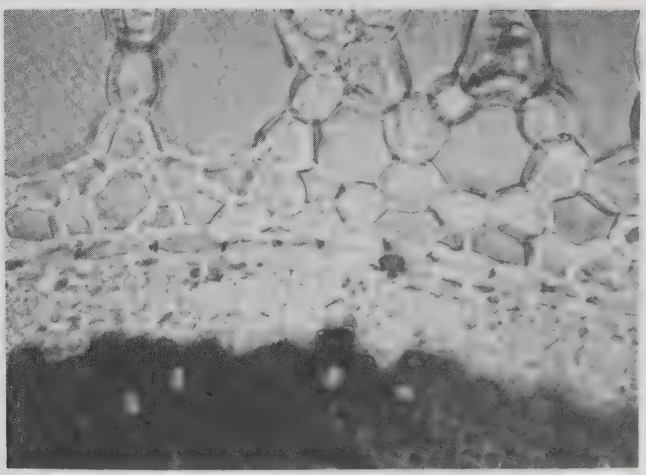


Abb. 15 : Querschnitt im Bereich der Endodermis
Anfärbung mit Phloroglucin-Perchlorsäure-Reagens
(Vergrößerung ca. 400fach)

Unterhalb der Endodermis (mit Casparyschem Streifen) kommen im Perizykel vereinzelt kleine Fasern vor, deren Zellwände stark verdickt und verholzt sind (Abb. 15).

In den Zellen des Phloems findet man kleine, höchstens 5 µm große Öltröpfchen (Sudan-III-Färbung).

Die stark getüpfelten, im Längsschnitt schmalen und kurzgliedrigen Gefäße (es kommen alle Arten von Gefäßtypen vor !) bilden einen geschlossenen Ring, in dessen Innerem das ebenfalls aerenchymatische Mark liegt. Die Interzellularräume sind hier aber wesentlich kleiner als in der Rinde. Verholzte Wandverstärkungen sind selten.

Niederblätter

Die schuppenförmigen Niederblätter des Rhizoms enthalten Öltropfen, gelbes Harz und kleine Oxalatrosetten, während die zum Teil rötlich gefärbten Knospenschuppen der Erneuerungstriebe bereits die bei den Laubblättern beschriebenen Drüsenschuppen aufweisen.

Wurzel

Auch bei der Wurzel kommt es, ebenso wie bei dem Rhizom, praktisch nicht zu sekundärem Dickenwachstum. Sie bietet daher in ihrem Aufbau das typische Bild einer jungen M a g n o l i a t a e - Wurzel mit heptarchem radialem Leitbündel (Abb. 16).

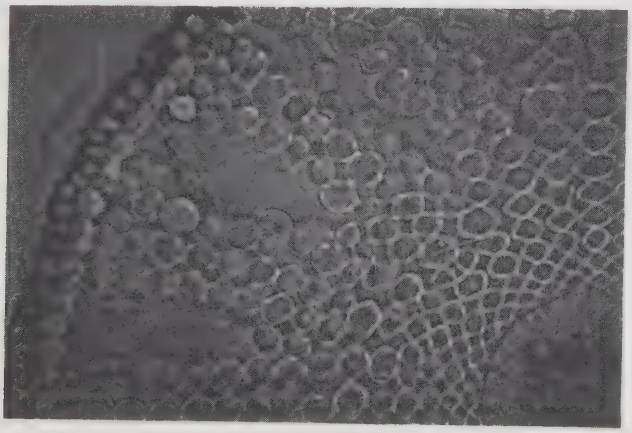


Abb. 16 : Querschnitt der Wurzel
(Vergrößerung ca. 200fach)

Das großlückige Parenchym der äußeren Rinde zeigt wiederum die Anpassung an den feuchten Standort der Pflanze durch Bildung eines Luftspeichergewebes.

Im inneren Teil der Rinde sieht man zwischen den radialen Reihen der Parenchymzellen rautenförmige Interzellularen, die dem Gewebe ein charakteristisches Muster geben.

In allen Parenchymzellen der unterirdischen Organe befinden sich viele Stärkekörner, die zum Teil in größeren Aggregaten, als Vierlinge (häufig), Drillinge oder auch als Einzelkörner vorkommen. Letztere sind etwa 5 µm groß.

4. Untersuchung der Inhaltsstoffe

4.1. Qualitative Analyse mit den üblichen phytochemischen Methoden

Durch eine allgemeine qualitative Analyse sollte ein erster Überblick über die zu erwartenden Inhaltsstoffe, ihr mengenmäßiges Vorkommen und ihre Verteilung innerhalb der Pflanze erhalten werden. Dazu wurden die ganzen Pflanzen gegen Ende der Blütezeit verwendet. Die getrockneten und gepulverten ober- und unterirdischen Teile wurden dann getrennt mit gebräuchlichen Analysenmethoden (s. Exp. Teil) auf verbreitete Wirkstoffgruppen untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tab. 2 (S. 40) zusammengefaßt.

Im einzelnen lassen sich dazu folgende Feststellungen treffen: In Übereinstimmung mit den Befunden von HOHMANN (1936) konnten keine S a p o n i n e in G r a t i o l a nachgewiesen werden. Der positive Ausfall der Schüttelschaumprobe dürfte auf andere glykosidische Inhaltsstoffe zurückzuführen sein.

G e r b s t o f f e scheinen in der Pflanze ebenfalls nicht oder nur in sehr geringen Mengen vorzukommen, wie der negative Ausgang der Fällungsreaktion mit Strychnin-NaCl-Lösung zeigt. Die Fällung mit Bleiacetat und die grüne Färbung mit Eisen-III-chlorid sind auf die vor allem in den krautigen Teilen vorhandenen F l a v o n o i d e (BORODIN, KURINNAYA 1970) zurückzuführen. Farbreaktion und positiver WILSON-TAUBÖCK-Test sprechen beide für 5-Hydroxy-flavone, wie sie in G r a t i o l a

Tab. 2 : Ergebnisse der qualitativen Analyse

Ausfall der Reaktion: ++ stark positiv, + positiv, (+) schwach positiv
- negativ
+? nicht eindeutig durch Auftreten von Mischfärbungen

Stoffgruppe	Art der Probe [1]	Ergebnis [2]	
		Kraut	Rhizome u. Wurzeln
Saponine	Schaumprobe	(+)	+
	Hämolyseversuch	-	-
Gerbstoffe	Farbreaktion mit $FeCl_3$	++ (grün)	+ (grün)
	Fällungsreaktionen		
	mit Blei-II-acetat	(+)	+
	mit Strychnin-NaCl-Lsg.	-	-
Anthraglykoside Aloine	BORNTRÄGER-Reaktion	(+)	-
	Fluoreszenz mit $Na_2B_4O_7$-Lsg.	+	+
Alkaloide	Fällungsreaktion mit Jodlösung	+	+
	mit MAYERs Reagenz	-	(+)
Cardenolid-glykoside	BALJET-Reaktion	+	(+)
	KEDDE-Reaktion	+?	(+)
	Xanthydrol-Reaktion	+?	(+)
Bitterstoffe	Geschmacksprüfung	++	+
Flavonoide	WILSON-TAUBÖCK-Test	++	-
	PEW-Test	-	-

1) s. Exp. Teil

2) s. dazu Anmerkungen im Text S. 39 u. 41

vorliegen sollen (BORODIN u. Mitarb. 1970, LITVINENKO u. Mitarb. 1970).

Inwieweit das Ergebnis der Prüfung auf Anthraglykoside ebenfalls durch den Gehalt an Flavonoiden verfälscht ist, wurde nicht weiter untersucht. Eine Bedeutung für die Wirkung der Droge dürfte ihnen nicht zukommen. Es handelt sich dabei, wenn überhaupt vorhanden, dann wohl nur um ein weiteres Vorkommen von in geringen Mengen nahezu ubiquitär verbreiteten Stoffen.

Das von BORODIN und KURINNAYA (1970) postulierte Vorkommen von Alkaloiden scheint nach dem Ausfall der Fällungsreaktionen unsicher. Abgesehen von der mehr oder weniger unspezifischen Fällung mit Jodlösung, ergab lediglich der Rhizom-Auszug mit MAYERs Reagenz einen schwachen Niederschlag. Die positiven Ergebnisse aus dem Gesamtextrakt konnten aber nach der weiteren Aufarbeitung, die eigentlich eine Konzentrierung der Alkaloide zum Ziele hatte, nicht mehr wiederholt werden. Wenn also überhaupt mit Alkaloiden im weiteren Sinne zu rechnen war, mußten diese Eigenschaften aufweisen, die von denen "klassischer" Alkaloide abweichen.

Am meisten interessierte der Ausfall der Prüfungen auf Cardenolidglykoside, die aber leider, bis auf die BALJET-Reaktion, nicht eindeutig ausfielen. Störend wirkte sich auch hier wieder, trotz vorangegangener Reinigung mittels Bleifällung, der Gehalt an Flavonoiden aus, der bei den meisten Farbreaktionen zu Mischfarben führte. Daß es bei der Alkalisierung immer wieder zu einer Farbvertiefung bzw.

Verschiebung nach Gelb kam, ist zum Teil auch auf die C u c u r - b i t a c i n e zurückzuführen, deren spektrale Maxima, soweit es sich um Diosphenole handelt, in alkalischem Milieu bathochrom verschoben werden. Dadurch ist vielleicht auch der eindeutig positive Ausgang der BALJET-Reaktion (alkal. Pikrinsäure-Lsg. ! Prüfung im Vergleich zu einer Blindprobe !) zu erklären, läßt man einmal außer acht, daß alle diese Reaktionen ohnehin wenig spezifisch sind, da sie vorwiegend auf der Reaktion mit aktiven Methylengruppen, wie sie in zahlreichen Verbindungen vorhanden sind, beruhen (zur Spezifität dieser Reaktionen vgl. auch KAKAC, VEJDELEK 1974).

Abschließend läßt sich sagen, daß durch diese Vorproben im wesentlichen die älteren Literaturangaben bestätigt wurden, daß aber die hier relevante Frage nach dem Vorhandensein von Cardenoliden mit diesen Methoden nicht geklärt werden konnte. Für eine präzisere Aussage war eine eingehendere Untersuchung notwendig; davon ist im folgenden Kapitel 4.2. die Rede.

4.2. Untersuchungen zur Frage des Vorkommens von Cardenoliden

Innerhalb der Familie der Scrophulariaceen sind bisher nur in der Gattung Digitalis (inkl. Isoplexis) Cardenolide sicher nachgewiesen worden, während das für die Gattung Penstemon postulierte Vorkommen von Cardenoliden auf Grund der publizierten Daten (CHANG u. Mitarb. 1971) eher zweifelhaft erscheint. Analog zu den Verhältnissen in anderen Pflanzenfamilien (z.B. Apocynaceen, Ranunculaceen), in denen das Vorkommen von Herzglykosiden in der Regel nicht nur auf einzelne Gattungen beschränkt ist, ist auch für die Familie der Scrophulariaceen eine weitere Verbreitung von Cardenoliden zu erwarten. Durch die bereits zitierten Berichte über eine Herzwirksamkeit des Gnadenkrautes (siehe 1.) hatten wir Grund zu der Annahme, in Gratiola ebenfalls Cardenolide vorzufinden. Aus chemotaxonomischen Gründen war deshalb die Prüfung des Gnadenkrautes auf eventuell vorkommende Glykoside des Digitalis - Typs besonders interessant. Hierfür wurden die für die Isolierung von Cardenolidglykosiden üblichen Methoden verwendet.

Man stellt dazu ein Infus der Droge mit 70prozentigem Alkohol her, verdünnt mit Wasser und fällt die Ballaststoffe (Flavonoide, Gerbstoffe) mit einer Blei-II-acetatlösung aus. Der Überschuß an Bleiionen wird mit Dinatriumhydrogenphosphatlösung aus dem Filtrat entfernt. Dadurch wird bei der folgenden Extraktion eine Emulsionsbildung vermieden. Zur weiteren Anreicherung der Glykoside schüttelt man die so vorgereinigte

Lösung mit Chloroform-Isopropanol (3+2) mehrfach aus. Durch dieses Verfahren lassen sich alle Substanzen von der Polarität der Cardenolid-Primärglykoside quantitativ aus dem vorgereinigten Extrakt abtrennen.

Die vereinigten organischen Auszüge werden nach der Trocknung über wasserfreiem Natriumsulfat unter vermindertem Druck bei 40 - 50 °C Badtemperatur am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt.

Dieses Verfahren wurde im Prinzip bei allen weiteren Untersuchungen angewendet und, wenn es für eine spezielle Fragestellung erforderlich war, entsprechend modifiziert (s. Exp. Teil).

Bei G r a t i o l a o f f i c i n a l i s erhielten wir auf diese Weise einen gelb-braunen, öligen Rückstand von eigentümlich aromatischem Geruch. Die Ausbeute betrug etwa zwei Prozent der eingesetzten Drogenmenge. - Das Ausgangsmaterial für d i e s e Untersuchungen bildete die Handelsdroge (siehe 2.), da zu Beginn meiner Arbeit nicht genügend frisches Material zur Verfügung stand und es sich absehen ließ, daß zu einer notwendigen Isolierung von eventuell nur in Spuren vorhandenen Cardenoliden eine größere Menge an Ausgangsmaterial aufzuarbeiten war.

Ebenso wie die selbstgeerntete Droge (siehe 4.1.) wurde auch der aus der Handelsdroge erhaltene Extrakt orientierenden Prüfungen auf Cardenolide unterworfen. Zusätzlich zu den bereits in Abschnitt 4.1. beschriebenen Farbreaktionen führten wir noch die Probe nach KELLER-KILIANI (KILIANI 1896) durch. Als "Glykosidstammlösung" diente eine ca. 20prozentige Lösung des oben

erwähnten Extraktrückstandes in Methanol. Über die Ergebnisse dieser Untersuchungen mit den klassischen Nachweisreagenzien auf Cardenolide informiert die Tabelle 3.

Tab. 3 : Ausfall der Prüfungen auf Cardenolide mit dem Chloroform-Isopropanol (3+2)-Extrakt

Reaktion	Färbung
KEDDE - Reaktion	weinrot
BALJET - Reaktion	orange
Xanthydrol - Reaktion	braun
KELLER - KILIANI - Reaktion	rotbrauner Ring in der Grenzzone, obere Schicht erst gelbgrün, später rötlich-braun

Um einen Einblick in Anzahl und Polarität der im Extrakt vorhandenen Substanzen zu gewinnen, wurden mit der verbleibenden Glykosidstammlösung orientierende chromatographische Untersuchungen durchgeführt.

Diese erfolgten einmal auf formamid-imprägniertem Papier mit dem System Chloroform-Tetrahydrofuran-Formamid (50+50+6,5) nach KAISER (1955), zum anderen auf selbstgestrichenen Kiesel-

gel GF_{254} - Platten mit dem System Äthylacetat-Pyridin-Wasser (5+1+4, Oberphase) (STEINEGGER u. VAN DER WALT 1961) und dem für Herzglykoside nahezu universell brauchbaren, von GÖRLICH (1965) eingeführten Fließmittel Methyläthylketon-Toluol-Wasser-Methanol-konz. Essigsäure (40+5+3+2,5+1).

Zur Sichtbarmachung der Substanzflecken wurden die Chromatogramme mit den in der Herzglykosid-Analytik bewährten Reagenzien nach JENSEN (1953), LAWDAY (1952) und KEDDE (1947) besprüht (Zusammensetzung der Sprühreagenzien s. Exp. Teil).

Auf dem Papierchromatogramm erschienen nach Behandlung mit den beiden erstgenannten Reagenzien drei Flecken bei hR_f - Werten von etwa 8, 23 und 75 (absteigende Entwicklung, Laufstrecke 35 cm); alle Zonen zeigten mit dem Trichloressigsäure-Chloramin-Reagenz nach JENSEN eine gelbe Färbung und Fluoreszenz (UV 365 nm), mit dem Antimontrichlorid - Reagenz nach LAWDAY eine graublaue Färbung. KEDDE - positive Zonen waren nicht zu erkennen; da diese Nachweisreaktion relativ unempfindlich ist, war daraus noch nicht unbedingt auf Abwesenheit von Cardenoliden zu schließen.

Die Dünnschichtchromatographie des Chloroform-Isopropanol (3+2)-Extraktes (auf Kieselgel-Platten unter Verwendung der genannten Fließmittelsysteme) brachte leider kein verwertbares Ergebnis (Schwanzbildung, Überladung der Schicht, Überwiegen von Ballststoffen).

Für die Entscheidung der Frage des Vorkommens von Cardenoliden schien eine weitergehende Reinigung der Extrakte notwendig zu sein; auch versuchten wir, durch eine photometrische Cardeno-

lidbestimmung einen Einblick in die allenfalls vorliegenden Mengen an Herzglykosiden zu gewinnen.

Abweichend von der eingangs beschriebenen Methode entfernte ich daher bei den weiteren Aufarbeitungen zuerst das Chlorophyll mit Petroläther aus der eingeengten Extraktlösung; diese wurde dann in üblicher Weise durch Bleifällung weiter gereinigt.

Um eine grobe Fraktionierung in lipophile und hydrophile Substanzen zu erreichen wurde das weitgehend gereinigte Filtrat zuerst mit Chloroform, dann mit Chloroform-Isopropanol (3+2) mehrfach ausgeschüttelt; zur Erfassung der stärker polaren Bestandteile wurde die wäßrige Phase mit Natriumsulfat bis zur Halbsättigung versetzt und erneut mit dem Chloroform-Isopropanol-Gemisch extrahiert.

Die vereinigten Chloroform- und Chloroform-Isopropanol-Auszüge wurden nach üblicher Trocknung unter vermindertem Druck zur Trockne eingedampft; es resultierten die mit E I (= Chloroform-Extrakt) und E II (= Chloroform-Isopropanol-Extrakt) bezeichneten, gelb bis braun gefärbten und intensiv bitter schmekkenden Trockenextrakte, die das Ausgangsmaterial für die weiteren Untersuchungen bildeten. - Die Ausbeuten betrugen im Mittel 0,8 Prozent (E I), bzw. 1,2 Prozent (E II) der eingesetzten Drogenmenge.

Eine mit diesen Extrakten durchgeführte Bestimmung des "Gesamtglykosid"-Gehaltes mit BALJET - Reagenz ergab Werte von 3,3 % für E I und 1,7 % für E II, beide berechnet als Digitoxin (MG 765) (s. Exp. Teil).

Obwohl die Gehaltsbestimmung für den Chloroform-Isopropanol-(3+2)-Extrakt E II den niedrigeren Wert ergeben hatte, entschieden wir uns doch, unsere Untersuchungen mit diesem fortzuführen. Für diese Entscheidung sprachen zwei Gründe: Einmal waren auf Grund der Polarität bekannter Verbindungen Cardenolidglykoside eher im Chloroform-Isopropanol-Extrakt zu erwarten; zum zweiten vermuteten wir ja nach den Ergebnissen der orientierenden Untersuchungen (siehe 4.1.), daß die in G r a t i o l a nachgewiesenen Cucurbitacine möglicherweise mit den Cardenolid-Reaktionen interferierten und so auch das Ergebnis der Gehaltsbestimmung beeinflußten. Nach den vorliegenden Literaturangaben sollte aber die Hauptmenge der bereits aus G r a t i o l a isolierten Cucurbitacine eher im Chloroform-Extrakt und nicht im Chloroform-Isopropanol-Extrakt anzutreffen sein.

Auf jeden Fall versprach die chromatographische Überprüfung von E II bei unserer Suche nach Cardenoliden eher einen Erfolg als die ersten in dieser Richtung unternommenen Versuche. -

Bei der Erprobung verschiedener chromatographischer Bedingungen zeigte sich bald, daß der Einsatz der Papierchromatographie für unsere Zwecke nicht erfolgversprechend war. Die PC liefert zwar gute Trennergebnisse, doch ist die Nachweisempfindlichkeit begrenzt. Dies hat seine Gründe einmal darin, daß sich die Substanzen bei der Trennung auf relativ große Flächen verteilen; zum anderen können empfindliche, aber agressive Reagenzien nicht eingesetzt werden, da sie meist zu einer Zerstörung der Chromatogramme führen.

Selbstbeschichtete Dünnschichtplatten waren ebenfalls ungeeignet, da sie nicht die für die vorliegenden komplexen Gemische nötige Trennschärfe besaßen. Mit Ausnahme der präparativen DC verwendete ich daher fortan Kieselgel-Fertigplatten bzw. Fertigfolien.

Bei der Auswahl der Fließmittelsysteme war ich darauf bedacht, nicht eine neue, nur für diesen speziellen Fall geeignete, Zusammensetzung einzuführen, sondern auf bewährte Systeme zurückzugreifen, die aus maximal drei Komponenten bestanden. Ich halte es nämlich für erforderlich, daß in Screening-Programmen auch für glykosidische Pflanzeninhaltsstoffe gewisse Standardfließmittel zur Verfügung stehen, ähnlich wie dies bei Alkaloiden und verwandten Verbindungen bereits der Fall ist. Der Vergleich mit Literaturangaben wird so meiner Meinung nach vereinfacht. Für unser Vorhaben war dies unumgänglich, da erstens nicht alle in Frage kommenden Verbindungen als Vergleichssubstanzen zur Verfügung standen, und zweitens die verwendeten Fließmittel aus naheliegenden Gründen in gleicher Weise für die Trennung sowohl von Herzglykosiden als auch von Cucurbitacinen geeignet sein sollten.

Diesen Anforderungen entsprachen am ehesten Gemische auf der Basis von Chloroform (wahlweise Dichlormethan) und Alkohol (Methanol oder Äthanol) mit oder ohne Zusatz von Wasser (Systeme I - V; siehe 9.3.3.3.).

Zur Detektion der Substanzzonen auf Dünnschichtchromatogrammen erwiesen sich in den Vorversuchen die Reagenzien nach JENSEN und LAWDAY als wenig geeignet, eine Beobachtung, die

für letzteres Reagenz nicht nur in unserem Falle zutrifft, sondern die auch schon, zum Beispiel, bei der Chromatographie von A d o n i s - Extrakten (JUNIOR 1978) gemacht worden war: Die erzielten Färbungen sind nur schwach und verblassen sehr schnell.- Im Falle des Reagenzes nach JENSEN bereitete des öfteren Schwierigkeiten, daß in den chromatographierten Extrakten auch zahlreiche Verbindungen mit Eigenfluoreszenz enthalten waren.

Als einziges Detektionsmittel mit zwar relativ geringer Empfindlichkeit aber einiger Spezifität blieb für die DC das Reagenz nach KEDDE. Es hat den weiteren Vorteil, daß die mit ihm besprühten Chromatogramme mit dem unspezifischen, aber sehr empfindlichen Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz nachbehandelt werden können (s. Exp. Teil). Die Kombination dieser beiden Sprühreagenzien wurde bei allen weiteren Untersuchungen bevorzugt angewendet.

Unter diesen Bedingungen waren im Chloroform-Isopropanol (3+2)-Extrakt E II drei schwach KEDDE-positive Zonen erkennbar, die in den Systemen III und VI mittlere R_f-Werte aufwiesen. Eine weitere Anreicherung dieser Substanzen sollte durch Verteilungschromatographie an wassergesättigtem Kieselgel nach STOLL u. Mitarb. (1951) versucht werden (SC 1; s. Exp. Teil). Über die Fraktionsvolumina und die nach dem Eindampfen der Fraktionen erhaltenen Rückstände unterrichtet die Tabelle 4.

Tab. 4 : Säulenchromatographische Auftrennung des Chloroform-Isopropanol (3+2)-Extraktes E II an wassergesättigtem Kieselgel (SC 1; s. Exp. Teil).

Elutionsmittel	Fraktion	Volumen [ml]	Gewicht des Rückstandes [mg]
Äthylacetat (wasserges.)	F A	100	157,8
"	F B	50	87,5
"	F C	50	56,0
" + 5 % Methanol	F D	100	64,4
" "	F E	50	28,8
" "	F F	100	65,2
" "	F G	150	83,7
" "	F H	450	132,0

Die Summe der Fraktionsrückstände ergab 675,4 mg (= 34 % der eingesetzten Menge an E II).

Von den einzelnen Fraktionsrückständen wurden 1-3prozentige Lösungen in Chloroform-Methanol (1+1) hergestellt; ihre Zusammensetzung überprüfte man in den Systemen I, III und VI (Auftragevolumina 10 - 20 µl).

Die Trennleistung von SC 1 war insgesamt gesehen unbefriedigend. Es erfolgte zwar eine weitgehende Abtrennung der Ballaststoffe, die mit den bisherigen Reinigungsoperationen noch nicht entfernt worden waren. Alle Fraktionen enthielten jedoch noch nahezu das gesamte Spektrum an Substanzen, die auch im Gesamtextrakt E II mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz nachzuweisen waren. Immerhin war eine gewisse Anreicherung KEDDE-positiver Substanzen in einzelnen Fraktionen zu verzeichnen.

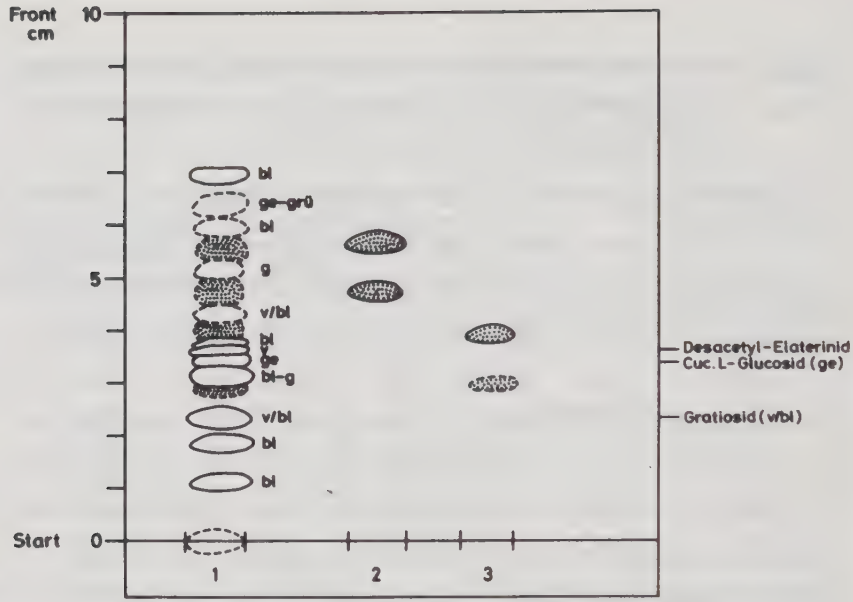


Abb. 17 : Dünnschichtchromatographische Kontrolle des Chloroform-Isopropanol (3+2)-Extraktes (E II) und der Fraktionen von SC 1

Schicht: Kieselgel F_{254} - Fertigfolie

Fließmittel: Äthylacetat-Pyridin-Wasser (4+1+5, Oberphase) System VI

Anfärbung: a) KEDDE - Reagenz (punktiert = violett)
b) Vanillin-H_2SO_4 (nur Bahn 1)

g = grau, ge = gelb, grü = grün, v = violett, v/bl = violett mit blauem Rand, bl = blau

1 = Chloroform-Isopropanol (3+2)-Extrakt (E II)
2 = Fraktionen FC, FD, FE
3 = Fraktionen FF, FG, FH

Die Identifizierung der Cucurbitacin-Glucoside im Gesamtextrakt E II erfolgte durch später vorgenommene Nachprüfungen (vgl. dazu 4.3.).

Drei Substanzen schienen in relativ größeren Mengen vorzuliegen; im System I (Chloroform-Äthanol, 95+5) wiesen sie R_f-Werte von 0,15 bis 0,25 auf, im System III (Chloroform-Methanol-Wasser, 85+14+1) lagen die entsprechenden Zonen im Bereich von R_f = 0,3 - 0,5 und im System VI (Äthylacetat-Pyridin-Wasser; 5+1+4, Oberphase) bei R_f-Werten zwischen 0,4 und 0,6 (Abb. 17, S. 52).

Die Fraktionsrückstände FC, FD und FE (Tab. 4, S. 51) wurden am LANGENDORFF - Präparat auf eine Herzwirksamkeit geprüft (siehe 7.2.). Eine Wirksamkeit im Sinne der Herzglykoside konnte man dabei nicht nachweisen.

Mit den übrigen Fraktionsrückständen führten wir die schon erwähnten Nachweisreaktionen erneut durch; ein eindeutiges Ergebnis konnte leider wieder nicht erhalten werden. Auch gelang es uns in zahlreichen dünnschicht- und papierchromatographischen Untersuchungen nicht, die KEDDE-positiven Substanzen mit bereits bekannten Cardenoliden in Verbindung zu bringen.

Die Anwendung verschiedener Sprühreagenzien (LIEBERMANN-BURCHARD - Reagenz auf Steroide und Triterpene; Xanthydrol-Reagenz auf Desoxyzucker) brachte uns auf dem Weg zu einer Identifizierung ebenfalls nicht weiter.

Der Einsatz präparativer DC und PC führte immerhin zur Isolierung von Mikrogramm - Mengen an KEDDE-positiven Substanzen, die die Aufnahme von UV-Absorptionsspektren ermöglichten. Diese zeigten immer das gleiche Bild: Hauptmaximum zwischen 205 und 208 nm, Schulter bei 222 nm, schwaches Maximum (etwa 1/5 der Intensität des Maximums bei 205 nm) zwischen

270 und 280 nm. Das charakteristische Absorptionsmaximum des Butenolid-Ringes der Cardenolide bei Wellenlängen zwischen 214 und 218 nm wurde in keinem Falle gefunden.

Ebensowenig wie eine Bestätigung für das Vorliegen eines Cardenolid-Grundgerüstes gefunden werden konnte, führten Spaltungsversuche (säurehydrolytisch und enzymatisch) zum Auffinden einer Zuckerkomponente.

Es bedarf eigentlich keiner Erwähnung, daß alle Methoden mit reinen Cardenolidglykosiden auf ihre Tauglichkeit geprüft wurden (Lanatosid C, Acetyl-Digoxin, Acetyl-Digitoxin, Glucodigifucosid, Digitalinum verum, k-Strophanthin-ß, Cymarin).

Die voranstehend beschriebenen negativen Befunde sowie die Ergebnisse der pharmakologischen Prüfungen (siehe 7.2. und 7.3.) berechtigen nach unserer Meinung dazu, die Frage nach einem Vorkommen von Cardenoliden in G r a t i o l a o f f i c i n a l i s L. zu verneinen. Endgültig konnte diese Feststellung jedoch nur sein, wenn es uns gelang, wenigstens eine der dünnschichtchromatographisch nachgewiesenen KEDDE-positiven Substanzen einer anderen Stoffgruppe zuzuordnen, bzw. sie zu identifizieren. -

Die zu diesem Zweck unternommenen Untersuchungen sind in den folgenden Kapiteln (4.3. und 4.4.) beschrieben.

4.3. Die triterpenoiden Inhaltsstoffe

4.3.1. Einführung

Nachdem die Suche nach Cardenoliden erfolglos verlaufen war, wandten wir unser Interesse verstärkt den in G r a t i o l a vorhandenen Cucurbitacin-Derivaten (Abb. 2, S. 11) zu. Dafür waren vor allem zwei Gründe maßgebend:

Einige Cucurbitacine enthalten in der Seitenkette an C_{17} eine zu einer Carbonylgruppe konjugierte Doppelbindung; man mußte also mit der Möglichkeit rechnen, daß diese Verbindungen mit den Cardenolidreagenzien (z.B. Reagenz nach KEDDE) positiv zu reagieren vermögen. Dies war zu überprüfen.

Zweitens stand auch noch die Identifizierung des KRUGschen "Gratiotoxins" aus; nach Lage der Dinge war das "Gratiotoxin" unter den in G r a t i o l a offenbar reichlich vorkommenden Triterpenoiden zu suchen.

Die Ziele unserer weiteren Untersuchungen waren damit im wesentlichen abgesteckt. Wir strebten aber auch noch an, weitere Cucurbitacin - G l y k o s i d e aus G r a t i o l a zu isolieren. Zu Beginn unserer Untersuchungen war nämlich nach den uns vorliegenden Literaturangaben nur ein einziges Glykosid eines Cucurbitacins (im engeren Sinne), nämlich Elaterinid (= Cucurbitacin E-Glucosid), isoliert und auch als Glykosid charakterisiert worden (LAVIE u. Mitarb. 1964; LE MEN u. Mitarb. 1968), während alle anderen Cucurbitacin-Glykoside nur über ihre Spaltprodukte identifiziert worden waren. Während der Arbeit an dieser Dissertation erhielten

wir Kenntnis von weiteren, durch SEIFERT und ELGAMAL (1977) aus *Ecballium elaterium* L. isolierten Glykosiden, die auf Grund der Analysendaten (vor allem spektroskopischer) als 2-O-ß-D-Glucopyranosylcucurbitacin B und 2-O-ß-D-Glucopyranosylcucurbitacin D identifiziert wurden.

Aus *Gratiola* selbst waren bisher nur Gratiogenin-Derivate, die Aglyka Cucurbitacin E, I und L sowie Elaterinid rein isoliert worden (siehe Seite 13), während Desacetyl-Elaterinid (= Cucurbitacin I-Glucosid) nur dünnschichtchromatographisch (im folgenden mit dc abgekürzt) nachgewiesen werden konnte.

Bei der erwähnten dc-Überprüfung durch GMELIN (1967) gelang es im übrigen nicht, das von TSCHESCHE u. Mitarb. (1964) isolierte Cucurbitacin L erneut nachzuweisen. Auch zur Klärung dieser widersprüchlichen Befunde hofften wir durch unsere Untersuchungen beitragen zu können.

4.3.2. Chromatographie und Isolierung von Cucurbitacin-Derivaten

a) Extraktion

Zum chromatographischen Nachweis und zur Isolierung der Cucurbitacine wird das Pflanzenmaterial den gleichen Extraktions- und Reinigungsoperationen unterworfen (GMELIN 1967), die sich auch für die Analyse der Herzglykoside bewährt haben (siehe 4.2., Seite 43). Darüberhinaus gelingt eine weitere grobe Fraktionierung des Roh-Bitterstoffgemisches in Cucurbitacine des Ketol- und des Diosphenol-Typs durch Ausschütteln mit verdünnter Natriumhydroxidlösung (GMELIN 1964). Hierbei besteht jedoch die Gefahr der Bildung von Artefakten, insbesondere durch Spaltung der Acetylverbindungen und durch hydroxylionenkatalysierte Wasseranlagerung an die zur Carbonylgruppe konjugierte Doppelbindung in der Seitenkette einiger Cucurbitacine.

Aus diesem Grunde wurde diese Art der Auftrennung von uns nicht durchgeführt. Befürchtungen, durch die übliche Reinigungsmethode (Bleifällung) ebenfalls Artefakte zu erhalten, erwiesen sich beim direkten chromatographischen Vergleich der so gewonnenen Extrakte mit nur durch Petroläther-Extraktion gereinigten Konzentraten als unbegründet. Da die Reinigung mit Petroläther allein nicht nur keinerlei Vorteile brachte, sondern dabei sogar eine noch größere Menge an unabgetrennten Ballaststoffen in Kauf genommen werden mußte, blieben wir bei dem bereits beschriebenen kombinierten Einsatz von Petroläther-Extraktion und Bleifällung (siehe 4.2. und Exp. Teil).

b) Vergleichssubstanzen

Zu Vergleichszwecken standen uns folgende Substanzen zur Verfügung: Die Cucurbitacine A, B, C, E, I und L [1] sowie Gratiosid und Gratiogenin [2].

Die Cucurbitacinglucoside Elaterinid und Desacetyl-Elaterinid haben wir aus Koloquinthen selbst hergestellt (s. Exp. Teil). Die Identität der isolierten Glucoside wurde durch spektroskopische Daten (UV, IR, MS) und Vergleich der Spaltprodukte mit authentischen Substanzen (s.o.) gesichert (siehe 4.3.3. und 9.4.).

c) Papierchromatographische Untersuchung der G r a t i o l a - Extrakte

Zur Identifizierung der bei den Voruntersuchungen auf dem Papierchromatogramm entdeckten Substanzzonen (siehe Seite 46) wurden die G r a t i o l a - Extrakte E I und E II neuerlich im Fließmittelsystem Chloroform-Tetrahydrofuran-Formamid (50 + 50 + 6,5) auf formamid-imprägniertem Papier chromatographiert, diesmal aber mit verschiedenen Laufzeiten von 8 und 15 Stunden.

---

1) Wir danken Herrn Prof. Dr. R. GMELIN, Berlin, auch an dieser Stelle für die Überlassung der Cucurbitacine.

2) Proben der Gratiogenin-Derivate wurden uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. R. TSCHESCHE, Bonn, zur Verfügung gestellt.

Als Vergleichssubstanzen dienten Elaterinid und Cucurbitacin E. Die Sichtbarmachung der Cucurbitacine erfolgte mit dem Vanillin-Phosphorsäure-Reagenz nach ZIELINSKI und KONOPA (1968). Nach 20minütigem Erhitzen bei 120 °C wurden die Chromatogramme sowohl bei Tageslicht als auch bei langwelligem UV-Licht (365 nm) untersucht. Die mehrzahl der Cucurbitacine erscheint dabei mit violetter bis violett-roter Farbe und roter Fluoreszenz im UV; nur die Verbindungen mit gesättigter Seitenkette ergeben eine gelbe Färbung und gelb-grüne Fluoreszenz (DUNCAN u. Mitarb. 1968).

Die beiden Chromatogramme sind in der Abbildung 18 (S. 61) dargestellt. Es wird deutlich, daß es sich bei zweien der in den Vorversuchen entdeckten Substanzen um Cucurbitacin E (hR_f 75, Laufzeit 8 Stunden) und Elaterinid (hR_f 23) gehandelt haben muß. Die dritte Substanz mit einem hR_f-Wert von 8 dürfte mit Desacetyl-Elaterinid identisch sein.

Legende zu Abb. 18 :

Papierchromatographische Untersuchung der G r a t i o l a - Extrakte.

Papier: SCHLEICHER und SCHÜLL 2043 b Mgl, formamid-imprägniert

Fließmittel: Chloroform-Tetrahydrofuran-Formamid (50 + 50 + 6,5)

Entwicklung: absteigend

A: 8 Stunden

B: 15 Stunden, Durchlaufchromatogramm

Anfärbung: Vanillin-Phosphorsäure (s. 9.3.3.1.)

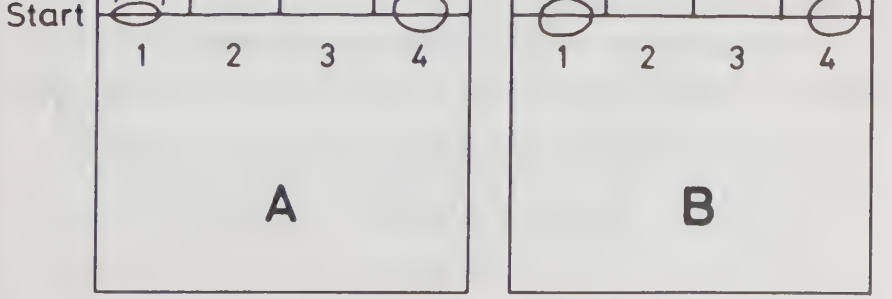
1 = Chloroform-Extrakt

2 = Cucurbitacin E

3 = Elaterinid

4 = Chloroform-Isopropanol (3+2)-Extrakt

Front


Start
1
2
3
4
A
1
2
3
4
B

violett
rot-violett
gelb

d) Dünnschichtchromatographische Untersuchungen

Die dc-Untersuchung der Cucurbitacin-Derivate erfolgte auf Kieselgel-Schichten vornehmlich in den Systemen I bis V (vgl. Seite 49). Für die Trennung der Aglyka erwiesen sich die Systeme I bis III als geeignet; die Glykoside trennte man in den Systemen II bis V (Zusammensetzung der Fließmittel siehe 9.3.3.3.).

Zur Sichtbarmachung der Substanzzonen standen zur Verfügung (Zusammensetzung der Sprühreagenzien s. Exp. Teil):

1) LIEBERMANN-BURCHARD-Reagenz

Reagenz auf Steroide (blau) und Triterpene (braun).

2) Eisen-III-chlorid-Reagenz

Aglyka vom Diosphenol-Typ (z.B. Cucurbitacin E): braun-violett

3) Vanillin-Phosphorsäure- und Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz

Beide Sprühreagenzien sind unspezifisch, aber empfindlich. Sie können auch noch angewendet werden wenn man die Chromatogramme bereits mit Eisen-III-chlorid-Lösung besprüht hat. Cucurbitacin-Aglyka und -Glykoside mit ungesättigter Seitenkette ergeben, je nach Konzentration, violette bis braune Färbungen, während in der Seitenkette hydrierte Verbindungen (z.B. Cucurbitacin L) gelb angefärbt werden.- Ein differenzierteres Verhalten gegenüber den beiden Reagenzien zeigen Gratiogenin-Derivate: Mit Vanillin-Schwefelsäure erscheinen die Substanzflecken blau mit violettem Rand, mit Vanillin-Phosphorsäure dagegen erst blau-grün, dann in gelb übergehend. Außerdem reagieren

Gratiogenin-Derivate mit dem Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz bereits in der Kälte, bzw. beim Besprühen der noch warmen DC-Platten. Beim nachfolgenden Erhitzen auf 120 °C erscheint von den übrigen Cucurbitacinen zuerst Cucurbitacin L, während die anderen Cucurbitacine erst nach etwa 3-5 Minuten reagieren.

Bei den Farbangaben ist zu beachten, daß vor allem eine Differenzierung zwischen roter, rotvioletter und blauvioletter Färbung schwierig ist, da Intensität und Farbtiefe stark konzentrationsabhängig sind. - Nach dem Erkalten der Chromatogramme gehen alle Farben innerhalb von etwa zwei Stunden in ein einheitliches Grau-Braun über.

4) 4-Dimethylaminobenzaldehyd-Phosphorsäure-Reagenz

Die Cucurbitacine A, B, E und I zeigen mit diesem Reagenz während des Erhitzens auf 120 °C einen charakteristischen Farbwechsel von Rot über Blau nach (Braun-) Violett; Cucurbitacin L wird gelb angefärbt, die Gratiogenin-Derivate erscheinen rosa.

5) Fluoreszenzlöschung

Cucurbitacin-Derivate sind ferner auf Schichten mit Fluoreszenzindikator an ihrer Fluoreszenzlöschung bei 254 nm zu erkennen, die aber bei den hydrierten Verbindungen schwach bis fehlend sein kann. Gratiogenin-Derivate sind auf diese Weise nicht zu erkennen.

Unter den voranstehend genannten Bedingungen konnten im Chloroform-Extrakt die Cucurbitacine E, I und L sowie Gratio-

genin chromatographisch identifiziert werden - obwohl eine vollständige Trennung der kritischen Paare Cucurbitacin E / Gratiogenin und Cucurbitacin I / Cucurbitacin L in den Standardsystemen I bis III nicht gelingt. DC in zwei Laufrichtungen ("zweidimensionale DC") mit den Systemen I und III sowie Entwicklung mit dem System VII ermöglichte aber eine so weitgehende Trennung, daß, in Kombination mit dem Ausfall der Farbreaktionen (siehe S. 62/63), an der Identität der Substanzen keine Zweifel bestehen (s. Abb. 19).

Als polarste Substanz des Chloroform-Extraktes (und in ihm auch mengenmäßig dominierend) erwies sich Elaterinid, das im Vergleich mit einer aus Koloquinthen hergestellten authentischen Probe identifiziert wurde. Der entsprechende Substanzfleck des Extraktes E I und der der Vergleichssubstanz zeigten in den Systemen I bis VI sowie bei der papierchromatographischen Untersuchung (bei Laufzeiten von 8 Stunden und 15 Stunden) (siehe S. 59 und Abb. 18) stets übereinstimmende Laufstrecken.

16-Hydroxy-gratiogenin konnte mangels Vergleichssubstanz nicht eindeutig identifiziert werden. Betrachtet man die von TSCHESCHE u. Mitarb. (1964) angegebenen R_f-Werte für Gratiogenin und dessen 16-Hydroxy-Derivat ($hR_{Gratiogenin} = 34$) einerseits und die R_f-Werte der zur Verfügung stehenden Vergleichssubstanzen im Fließmittel Chloroform-Aceton (6 + 1) (System VIII) andererseits, so läßt sich ableiten, daß eine zusätzliche OH-Gruppe in Stellung 16 die gleichen Polaritätsänderungen verursacht wie dies beim Übergang von 25-Acetoxy- zu 25-Hydroxycucurbitacinen der Fall ist. Demnach dürfte der blau-violette

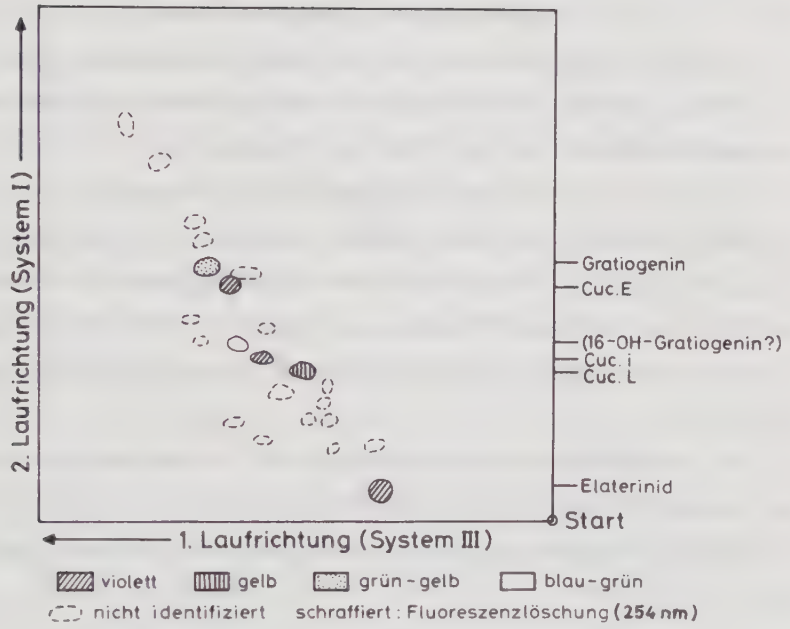


Abb. 19 : "Zweidimensionales" Dünnschichtchromatogramm des Chloroform-Extraktes aus G r a t i o l a.

Schicht: Kieselgel 60 F_{254} - Fertigplatte

Fließmittel: 1.Laufrichtung: System III
2.Laufrichtung: System I

Anfärbung: a) Eisen-III-chlorid (Cucurbitacine E, I und L)
b) Vanillin-Phosphorsäure (die Farbangaben beziehen sich nur hierauf)

(Vanillin/H_2SO_4) Substanzfleck im Dünnschichtchromatogramm des Chloroform-Extraktes, der geringfügig höhere R_f-Werte als Cucurbitacin I aufweist (System I: R_f = 0,3; System VIII: R_f = 0,1), dem 16-Hydroxy-gratiogenin entsprechen.

Inwieweit Cucurbitacine mit dem KEDDE-Sprühreagenz anfärbbar sind, ermittelten wir durch Chromatographie steigender Mengen von Cucurbitacin E: Erst bei Konzentrationen über 100 µg Cucurbitacin E pro Startpunkt war eine Färbung zu erkennen, in Konzentrationsbereichen also, die üblicherweise bei der qualitativen DC nicht erreicht werden. Dagegen waren bereits 0,5 µg gut durch Fluoreszenzlöschung zu erkennen und ergaben nach Besprühen mit Vanillin-Schwefelsäure einen gut sichtbaren Fleck.

In der Tabelle 5 sind zusammenfassend die durchschnittlich gefundenen hR_f-Werte der im Chloroform-Extrakt identifizierten Verbindungen für die am häufigsten gebrauchten Systeme angegeben.

Tab. 5 : Ungefähre hR_f-Werte der Cucurbitacin-Derivate des Chloroform-Extraktes in verschiedenen Fließmittelsystemen (Schicht: Kieselgel G, 0,25 mm; Laufhöhe 12 - 15 cm).

Substanz	System I	IIa	III	VII	VIII	IX
Cuc. E	48	70	68	58	31	71
Gratiogenin	46	68	66	52	31	-
Cuc. I	28	62	55	33	9	36
Cuc. L	25	60	52	26	9	36
Elaterinid	5	26	30	0	-	-

Im Chloroform-Isopropanol (3+2)-Extrakt konnte zunächst nur Gratiosid in direktem dc-Vergleich mit authentischer Substanz einwandfrei identifiziert werden (siehe Abb. 17, S. 52). Das Diglucosid des Gratiogenins (Strukturformel s. Abb. 2, S. 11) war auf Grund der Fleckgröße als das Hauptglykosid des die stärker polaren Substanzen enthaltenden Extraktes E II zu bezeichnen (etwa 25 %). Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Befunden anderer Autoren (vgl. Seite 13).

Gratiogenin-monoglucosid, von TSCHESCHE u. Mitarb. (1964) zusammen mit Gratiosid, Gratiogenin und Cucurbitacin L aus einem alkoholischen G r a t i o l a - Extrakt isoliert, tritt wahrscheinlich als ein wie Gratiosid reagierender Fleck bei hR_f-Werten von 22 (System IIa) und 44 (System VI; vgl. Abb. 17, S. 52) auf und war als solcher auch schon im Chloroform-Isopropanol (3+2)-Gesamtextrakt dünnschichtchromatographisch zu erkennen. - Die Identifizierung erfolgte im Vergleich mit der Lösung eines Substanzgemisches, das bei der fermentativen Spaltung (15 Stunden; siehe 9.3.4.) von authentischem Gratiosid erhalten wurde. Von den drei darin nachweisbaren blauen (Vanillin/H_2SO_4) Substanzzonen erwiesen sich zwei in verschiedenen Fließmitteln als identisch mit Gratiogenin (Hauptmenge) und noch nicht gespaltenem Gratiosid (wenig). Den dritten (sehr schwachen) Fleck mit mittlerer Polarität interpretieren wir als das Monoglucosid.

Des weiteren wurden im Chloroform-Isopropanol (3+2)-Extrakt (E II) zwei Substanzzonen (zunächst als "Glykosid a" und "Glykosid b" bezeichnet) nachgewiesen, die auf Grund ihres Anfärbeverhaltens und ihrer R_f-Werte (in Relation zu Elaterinid) in

den Standardfließmitteln (siehe 9.3.3.3.) als Desacetyl-Elaterinid (GMELIN 1967) und Cucurbitacin L-Glucosid angesehen wurden. Nach fermentativer Spaltung des Extraktes E II (siehe 9.3.4.) waren die entsprechenden Aglyka nachweisbar (vgl. Seite 64 f.).

Da beide Glucoside, wie in der Einführung zu diesem Abschnitt (s. Seite 55) ausgeführt, unseres Wissens noch nicht rein isoliert wurden, bzw. über das Vorkommen von Cucurbitacin L - Glucosid in G r a t i o l a bisher noch keinerlei Angaben gemacht wurden, strebten wir eine Isolierung der Substanzen in reiner Form und ihre Charakterisierung an.

e) Isolierung von Cucurbitacinglykosiden durch Säulenchromatographie an Kieselgel

Die Übertragung dünnschichtchromatographischer Trennbedingungen auf die Säulenchromatographie an Kieselgel gelang im Fall der Cucurbitacin-Aglyka bereits durch GMELIN (1963). Wir durften daher annehmen, zur Trennung der Glykoside im präparativen Maßstab den gleichen Weg beschreiten zu können. Vorversuche, in denen Chloroform-Isopropanol (3+2)-Extrakte an Kieselgel der Aktivitätsstufe 2-3 mit Chloroform-Methanol-Mischungen chromatographiert wurden, zeigten, daß auf diese Weise eine Gewinnung der uns interessierenden Substanzen möglich war (SC 3 und SC 4; siehe 9.3.3.4.). Die Substanzen "Glykosid a" und "Glykosid b" waren demnach mit Chloroform, das etwa 5 Prozent Methanol enthielt, von der Säule zu eluieren. Der Hauptversuch (mit etwa der zehnfachen Menge an Aus-

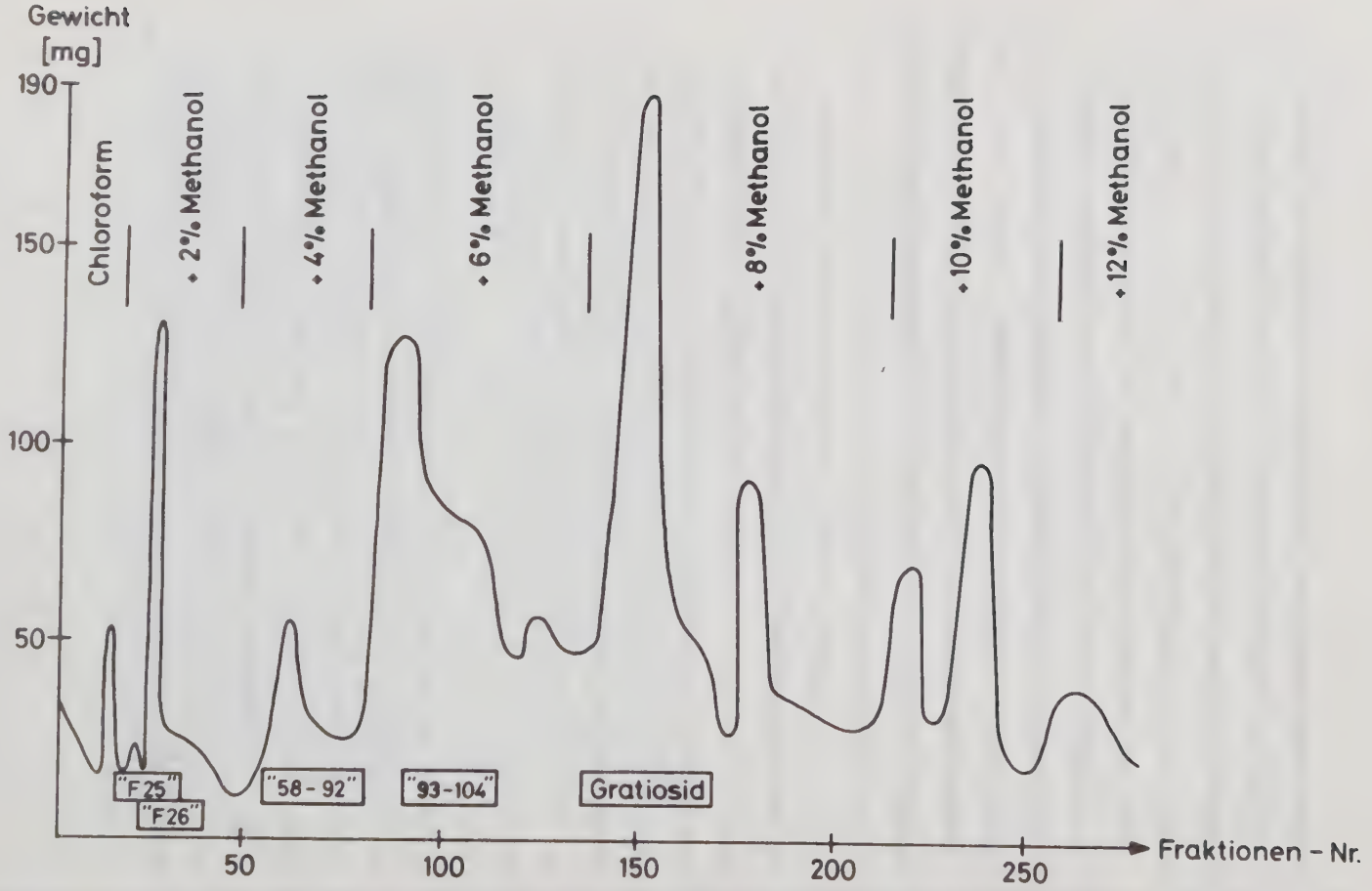
gangssubstanz wie in den Vorversuchen) wurde mit dem Extrakt E II_H (s. Exp. Teil) durchgeführt, der etwa 5 Prozent der Cucurbitacinglykoside (berechnet als Elaterinid; vgl. 5.) enthielt (SC 5; siehe 9.3.3.4.).

Über den Verlauf der Trennung und die Gewichte der Fraktionsrückstände gibt die Abbildung 20 einen Überblick. Gleichzeitig ist aus ihr ersichtlich, welche Fraktionen im Rahmen dieser Arbeit eingehender untersucht wurden.

Während des in der Abbildung 20 dargestellten Chromatographie-Verlaufes traten etwa 70 Prozent der eingesetzten Menge an E II_H aus der Säule wieder aus.

Um die Kapazität der Säule zu entlasten waren bereits vor dem Beschicken etwa 2 g Gratiosid, die aus der Auftragslösung auskristallisierten, entfernt worden. Wie die Abb. 20 aber erkennen läßt, war Gratiosid trotzdem noch immer das mengenmäßig dominierende Glykosid des Extraktes E II_H. Das reichliche Vorkommen und die relativ gute Kristallisierbarkeit sind wohl auch die Gründe dafür, daß Gratiosid als eine der ersten Substanzen aus G r a t i o l a in reiner Form isoliert werden konnte (vgl. 1.).

Außer mit der Methode des Auskristallisierens zur Gewinnung von Substanzen, die in größeren Mengen vorliegen, wurden Cucurbitacinglykoside bisher noch durch Ausfällen mit Petroläther/Äther (LAVIE u. Mitarb. 1964) oder ebenfalls durch Chromatographie an Kieselgel (LE MEN u. Mitarb. 1968; SEIFERT, ELGAMAL 1977) und Sephadex® (SEIFERT, ELGAMAL 1977) in präparativem Maßstab gewonnen. Wir wandten außerdem noch, in direkter Über-


Gewicht
[mg]
190
150
100
50
Chloroform
+ 2% Methanol
+ 4% Methanol
+ 6% Methanol
+ 8% Methanol
+ 10% Methanol
+ 12% Methanol
"F25"
"F26"
"58 - 92"
"93-104"
Gratiosid
50
100
150
200
250
Fraktionen - Nr.

Legende zu Abb. 20 : Schematische Darstellung des Trennverlaufes von SC 5 (s. 9.3.3.4.) anhand der durchschnittlichen Fraktionsrückstandsgewichte

Fraktionen zu 1 l.

Über dem Kurvenbild ist die jeweilige Zusammensetzung der mobilen Phase angegeben, die Angaben unterhalb betreffen die näher untersuchten Fraktionen (siehe 4.3.3. und 4.4.).

tragung dünnschichtchromatographischer Bedingungen, erfolgreich die Trockensäulentechnik bei der Gewinnung eines Teiles der Elaterinid-Vergleichssubstanz aus Koloquinthen an (SC 2; siehe 9.3.3.4.).

4.3.3. Identifizierung und Charakterisierung neuer Cucurbitacin-Glucoside

a) Elaterinid

Am Beispiel des aus Koloquinthen isolierten Elaterinids (siehe 9.4.) sollen die Methoden vorgestellt und diskutiert werden, die wir zur Konstitutionsermittlung der Cucurbitacinglucoside anwendeten. Es sind dies in erster Linie der chromatographische Nachweis von Aglykon und Zuckerkomponente (siehe 9.3.3.) nach fermentativer oder säurehydrolytischer Spaltung (siehe 9.3.4.) sowie die Elektronen- und IR-spektroskopische Charakterisierung der Glucoside und der Aglyka (siehe 9.3.7.).

Ausgehend von der Tatsache, daß die nach Isolierung und Reinigungsoperationen verbleibenden Substanzmengen meist zu klassischen Analysenverfahren nicht ausreichen, sollten auch Erfahrungen über Möglichkeiten der massenspektrometrischen Analyse (siehe 9.3.7.) gesammelt werden, über die bisher in der Literatur erst wenige Angaben vorliegen.

Das abschließend durch präparative DC gereinigte Elaterinid erwies sich als hell cremefarbenes, intensiv bitter schmeckendes Pulver. Der Schmelzpunkt war scharf und lag bei 162 °C (Literatur: 160 °C; LE MEN u. Mitarb. 1968).

Durch eintägige Einwirkung von ß-Glucosidasen konnte der größte Teil des eingesetzten Elaterinids in Cucurbitacin E und Glucose (chromatographisch nachgewiesen; s. 9.3.3.) gespalten werden, während nach Kochen mit 2 N Schwefelsäure (siehe 9.3.4.) auch nach drei Stunden erst ein geringer Prozentsatz hydrolysiert war. - Die spezifische Drehung (s. 9.3.6.) des isolierten Elaterinids betrug -61 ° in Chloroform (LE MEN u. Mitarb. 1968: -60 °) bzw. -46 ° in Äthanol (LE MEN u. Mitarb. 1968: -50 °). Die Differenz der molekularen Drehungen (in Chloroform) von Cucurbitacin E (MG 556; $[\alpha]_D^{20}$ = -60 °, GMELIN 1967) und Elaterinid (MG 718; Strukturformel siehe Abb. 2, S. 11) liegt bei -105 °. Nach den Regeln von KLYNE (1950) ist Elaterinid demnach ein ß-D-Glucosid. Für die ß-Konfiguration der glykosidischen Bindung spricht auch die leichte Abspaltbarkeit der Glucose durch ß-Glucosidasen (vgl. auch 6.3.).

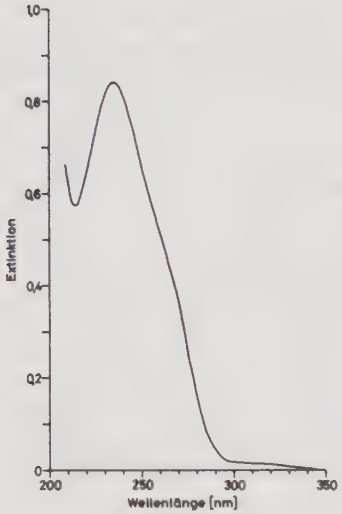


Abb. 21 : UV-Absorptionsspektrum von Elaterinid
(in Äthanol, c = 2,5 mg / 50 ml)

Im Gegensatz zu seinem Aglykon läßt sich Elaterinid auf DC-Platten nicht mit Eisen-III-chlorid-Reagenz anfärben. Auch fehlt im UV-Absorptionsspektrum (s. Abb. 21) das für die Diosphenol-Gruppierung charakteristische Maximum bei 270 nm (vgl. Abb. 22, S. 74). Der Zucker muß also mit der OH-Gruppe am C-2 des Cucurbitacins E verknüpft sein. - Das Maximum im UV-Spektrum bei einer Wellenlänge von 234 nm liefert einen Hinweis auf die α,β-ungesättigte Carbonylgruppe in der Seitenkette (ε = 12060; log ε = 4.08).

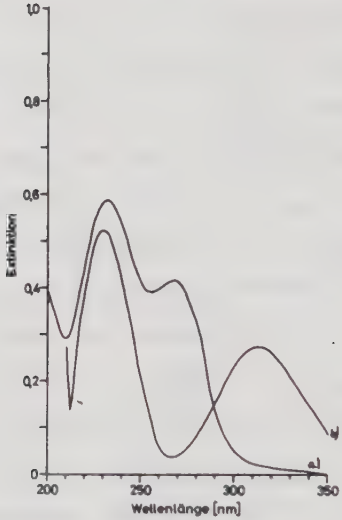


Abb. 22 : UV-Absorptionsspektrum von Cucurbitacin E
a) in Äthanol, c = 2,5 mg / 100 ml
b) in äthanol. NaOH

Das IR-Spektrum (s. Abb. 23) bestätigt die gefundenen Strukturmerkmale: $\tilde{\nu}$ $[cm^{-1}]$: 3450 (OH), 1730 (OAc), 1690 (3-, 11-, 22- keto), 1635 (C=C), 1265 (OAc). - Die breite OH-Valenzschwingungsbande zwischen 3700 und 3100 cm^{-1} sowie die der C-O-Valenzschwingungen zwischen 1000 und 1100 cm^{-1} sind auf den Zuckeranteil zurückzuführen (Zuordnung nach HYLANDS, SALAMA 1976; SEIFERT, ELGAMAL 1977). Zum Vergleich ist das IR-Spektrum von Cucurbitacin E abgebildet (Abb. 24).

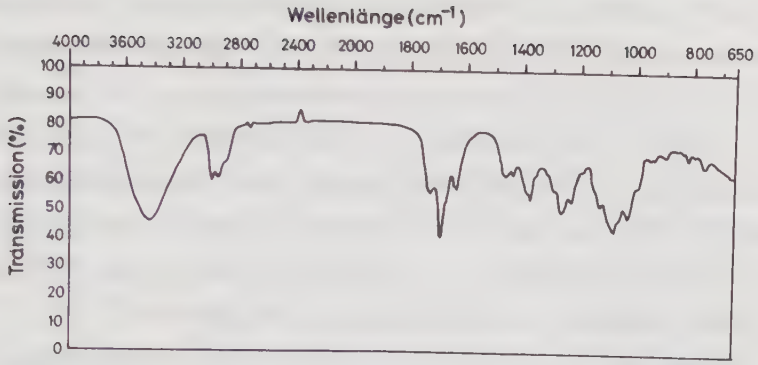


Abb. 23 : IR-Spektrum von Elaterinid (in KBr)

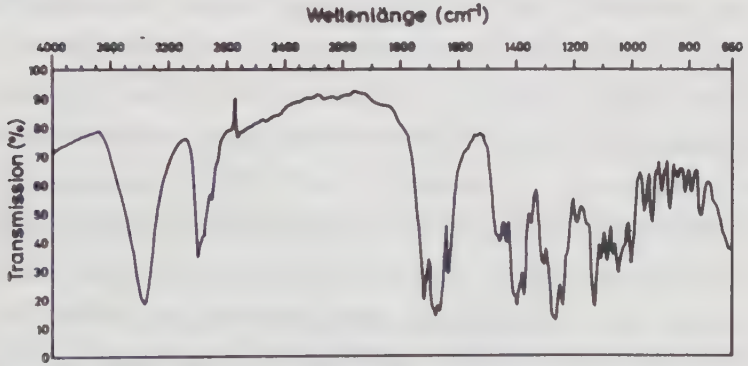


Abb. 24 : IR-Spektrum von Cucurbitacin E (in KBr)

Massenspektrometrischen Untersuchungen wurden Cucurbitacin-Glucoside bisher nur von SEIFERT u. ELGAMAL (1977) unterzogen (EAMS, 2-4 eV). Selbst unter diesen als schonend zu bezeichnenden Bedingungen konnten keine Molekülpeaks erhalten werden. Im Falle des Glucosids von Cucurbitacin B (= 1,2-Dihydro-cucurbitacin E) entstand das Fragment mit der höchsten Massenzahl durch Abspaltung von zwei Molekülen Wasser, bei dem Glucosid von Cucurbitacin D (= 1,2-Dihydro-cucurbitacin I) war die höchste Massenzahl m/e 498 (Aglykon - 1 H_2O).

In Analogie zu ähnlichen Problemen bei der Untersuchung von Cardenolidglykosiden (BROWN u. Mitarb. 1970) versprachen wir uns von dem Einsatz der Feldionisations-Massenspektrometrie (FI) Aufschlüsse über Zuckerkomponente und Genin. Allerdings werden von den zitierten Autoren bereits Einschränkungen hinsichtlich der Anwendbarkeit der FI-Massenspektrometrie bei glucosehaltigen Glykosiden und bei Aglyka mit mehreren freien Hydroxylgruppen gemacht. Diese Einschränkungen treffen auch für Elaterinid zu, wo ebenfalls Peaks höherer Massenzahlen, die Hinweise auf die Struktur liefern würden, fehlten und die Spektren darüberhinaus schlecht reproduzierbar waren. Basispeak (BP) war in den meisten Fällen m/e 60 (Acetat).

Bei mehrfacher Aufnahme der Spektren unter praktisch gleichen Bedingungen erschienen die Peaks der höchsten Massenzahlen bei:

m/e 526 (78 %; M^+ - 2 H_2O - 156; BP 157),
509 (22 %; Aglykon - 3 H_2O + H; BP 60),
399 (38 %; Aglykon - 157; 96 (BP), 60 (90 %)),
oder 365 (10 %; Aglykon - 2 H_2O - 155; BP 60).

Die Abspaltung von Teilen der Seitenkette (155 - 157 amu Differenz; Glucose-Rest: 162 amu Differenz) ist also schon auf der Glykosid-Stufe möglich wie das Fragment m/e 526 zeigt.

Überhaupt hat die ungesättigte Seitenkette zerfallsdirigierenden Charakter; dies wird an den Elektronenstoß(EI)-Massenspektren der entsprechenden Cucurbitacin-Aglyka deutlich. Der dominierende Fragmentierungsweg ist eine Spaltung der C-20-C-22-Bindung unter gleichzeitiger Übertragung des Wasserstoffatoms der Hydroxylgruppe an C-20 auf den abgespaltenen Rest, der bei allen Cucurbitacinen mit ungesättigter Seitenkette zu einem intensiven Peak bei m/e 96 führt. Dem entsprechenden Ion kommt auf Grund genauer Massenmessung die Zusammensetzung $C_6H_8O^+$ zu (AUDIER, DAS 1966). Auch eine einfache Spaltung der C-20-C-22-Bindung ohne Wasserstoffübertragung ist zu beobachten, in deren weiterem Verlauf der Verlust eines Moleküls Wasser vom größeren Fragment möglich ist (m/e 403-401 ⟶ 385-383).

Für Diosphenol-Cucurbitacine ist außerdem noch ein Fragment bei m/e 164 ($C_{10}H_{12}O_2^+$) charakteristisch, das durch RDA-Umlagerung in Ring B entstehen soll.

Für das Aglykon des Elaterinids (nach fermentativer Spaltung durch präp. DC isoliert) erhielten wir im EI-Spektrum (70 eV), dessen oberer Bereich in Abb. 25 dargestellt ist, folgende herausragende Peaks: m/e 496 (100 %; M^+ - Acetat), 478 (24 %), 400 (32 %), 383 (48 %), 367 (12 %), 333 (85 %), 315 (34 %), 219 (66 %), 204 (66 %), 203 (66 %), 164 (68 %), 147 (68 %), 113 (70 %), 96 (68 %), 60 (75 %) (Zuordnungsversuche bei DUNCAN u. Mitarb. 1968).

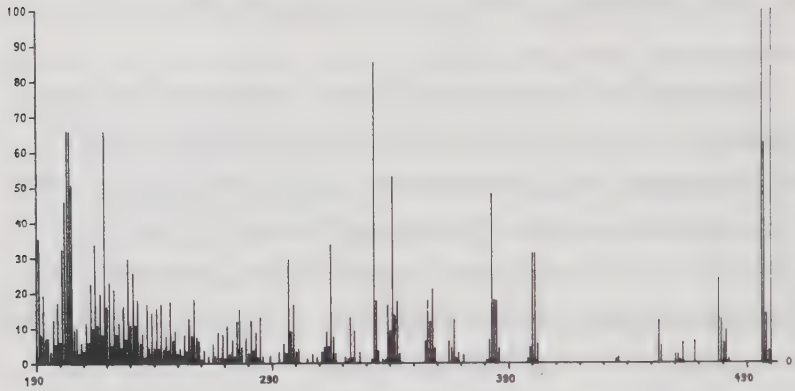


Abb. 25 : Oberer Bereich des EI-Massenspektrums von Cucurbitacin E (70 eV)

Das Felddesorptions(FD)-Massenspektrum des Aglykons von Elaterinid ergab je nach Aufnahmebedingungen Massenzahlen von 557 (M^+ + 1) bis 560 (M^+ + 4) (Peaks mit meist größerer Intensität bei Massenzahlen von 494, 397, 96 und 60).

Dagegen lieferte das FD-Massenspektrum von Elaterinid wider Erwarten keinen Molekül- oder M^+ + 1-Peak. Die größte Intensität zeigte vielmehr ein Peak bei einer Massenzahl von 741 (M^+ + 23), den man als Anlagerung von Na^+-Ion an die Zuckerkomponente des Glykosides interpretieren kann. Nach PROME und PUZO (1977) läßt sich dies bei der FD-Massenspektrometrie von Oligosacchariden häufig beobachten. Die Natrium-

ionen stammen meist aus den verwendeten Lösungsmitteln, in unserem Fall rühren sie wahrscheinlich von der Gewinnung des Elaterinids mittels präparativer DC her. - Weitere charakteristische Massenpeaks finden sich bei 700 (M^+ - 1 H_2O), 556 (Aglykon), 163, 157, 111 und 95. Darüberhinaus erscheinen Peaks bei sehr viel höheren Massen als M^+, die wahrscheinlich auf Dimerisierungen auf der Aglykon-Stufe und anschließende Fragmentierung zurückzuführen sind (vgl. FD-Spektrum von Desacetyl-Elaterinid, S. 84).

b) Desacetyl-Elaterinid

Die Fraktionen 58 - 92 (SC 5; s. Abb. 20, Seite 70) lieferten nach dem Eindampfen etwa zwei Gramm eines gelben, bitter schmeckenden Pulvers. Die Ausbeute entspricht etwa zehn Prozent des Extraktes E II_H. - Durch Lösen in Äthanol und Zugabe von Chloroform, Äther und Petroläther wurde eine hellgelbe Fällung (in 12prozentiger Ausbeute) erhalten; dünnschichtchromatographisch ließen sich in ihr vier Substanzen nachweisen, von denen zwei hinsichtlich der R_f-Werte mit den als "Glykosid a" und "Glykosid b" bezeichneten Substanzzonen aus dem Chloroform-Isopropanol(3+2)-Extrakt (s. Seite 67) übereinstimmten. Durch präparative DC im System XI gelang eine weitgehende Trennung der beiden Glykoside.

Von "Glykosid a" gewann man auf diese Weise etwa zehn Milligramm feiner Plättchen (aus Äthanol-Chloroform).

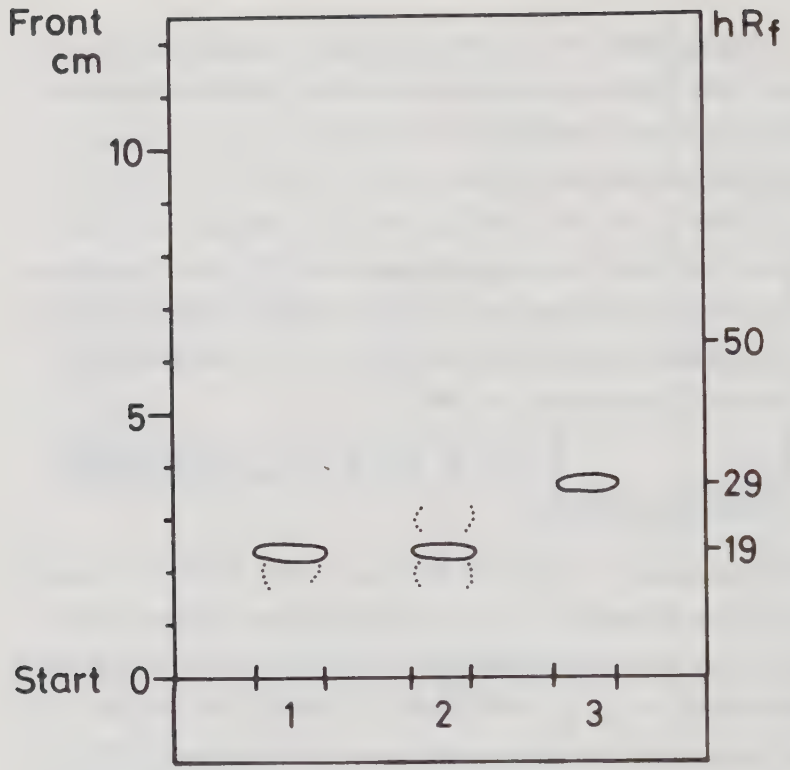


Abb. 26 : Dc-Vergleich isolierter Cucurbitacin-Glucoside aus C i t r u l l u s c o l o c y n t h i s und G r a t i o l a o f f i c i n a l i s

Schicht: Kieselgel F_{254} - Fertigfolie

Fließmittel: Chloroform-Äthanol (85 + 15)
System IIa

Anfärbung: a) Eisen-III-chlorid: alle negativ
b) Vanillin-Schwefelsäure: Hauptflecken alle violett

1 = Desacetyl-Elaterinid-Präparat aus C. c o l o c y n t h i s

2 = "Glykosid a" aus G. o f f i c i n a l i s

3 = Elaterinid aus C. c o l o c y n t h i s

"Glykosid a" zeigte bei der DC in verschiedenen Fließmitteln (Systeme IIa, III und V; s. Abb. 26, Seite 80) übereinstimmende Laufstrecken mit Desacetyl-Elaterinid, das als Nebenprodukt bei der Isolierung von Elaterinid aus Koloquinthen erhalten worden war (siehe 9.4.).

Die IR-Spektren der beiden Substanzen sind praktisch identisch (s. Abb. 27, Seite 81). Gegenüber dem IR-Spektrum von Elaterinid (s. Abb. 23, Seite 75) fehlt die Bande bei 1730 cm^{-1}, die dem Acetylrest zugeschrieben wurde.

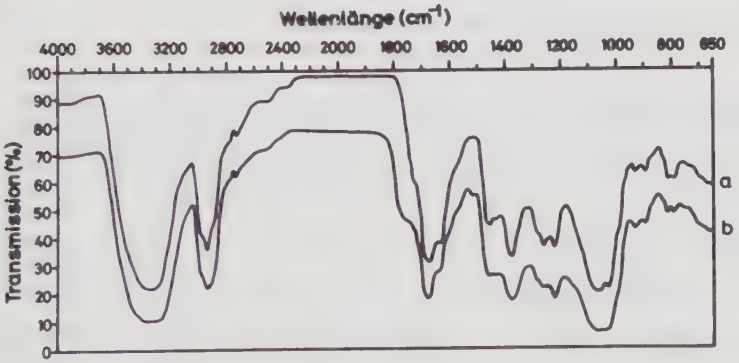


Abb. 27 : IR-Spektren von Desacetyl-Elaterinid (a) und "Glykosid a" (b) (in KBr)

Nach fermentativer Spaltung (siehe 9.3.4.) konnten bei beiden Substanzen Cucurbitacin I (IR-Spektrum s. Abb. 28) und Glucose im Vergleich mit authentischen Proben chromatographisch nachgewiesen werden (siehe 9.3.3.).

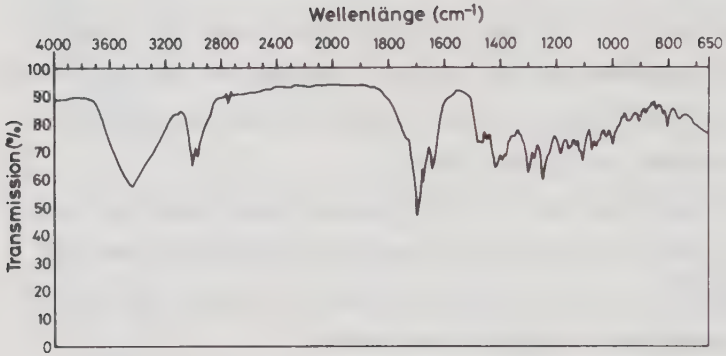


Abb. 28 : IR-Spektrum von Cucurbitacin I (in KBr)

Desacetyl-Elaterinid gibt, wie Elaterinid, eine negative Reaktion mit Eisen-III-chlorid; dies ist als Hinweis auf eine glykosidische Bindung der diosphenolischen OH-Gruppe zu werten. Das UV-Spektrum (siehe Abb. 29), das von der aus G r a t i o l a isolierten Substanz angefertigt wurde, weist ebenfalls nur das der Enon-Gruppierung in der Seitenkette zugeschriebene Maximum bei 234 nm auf (ε = 9730, log ε = 3.87). Zum Vergleich ist in Abbildung 30 (Seite 83) das UV-Absorptionsspektrum des Aglykons abgebildet.

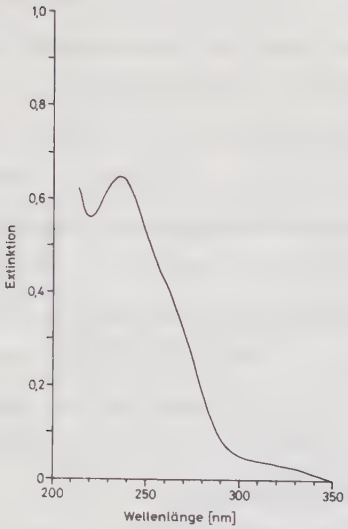


Abb. 29 : UV-Absorptionsspektrum von Desacetyl-Elaterinid (in Methanol, c = 1,1 mg / 25 ml)

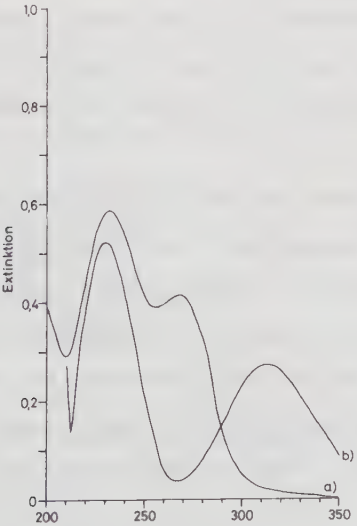


Abb. 30 : UV-Absorptionsspektrum von Cucurbitacin I
a) in Äthanol, c = 2,5 mg / 100 ml
b) in äthanol. NaOH

Die spezifische Drehung des Glucosides betrug etwa -47 ° (Methanol). Die Differenz der molekularen Drehungen (in Methanol) von Cucurbitacin I (MG 514; $[\alpha]_D^{22}$ = -52 °, GMELIN 1967) und Desacetyl-Elaterinid (MG 676; Strukturformel siehe Abb. 2, Seite 11) liegt bei -51 °. - In Übereinstimmung mit den auf Seite 72 gemachten Ausführungen ist Desacetyl-Elaterinid daher als 2-O-ß-D-Glucosylcucurbitacin I zu bezeichnen.

Diese Interpretation wird indirekt dadurch gestützt, daß die milde alkalische Hydrolyse von Elaterinid (mit $KHCO_3$ bei Raumtemperatur; s. 9.3.5.) eine Substanz ergab, die bei der DC in den Systemen IIa, III und XI gleiche R_f-Werte wie Desacetyl-Elaterinid aufweist (s. Abb. 31).

Als Desacetyl-Verbindung war Cucurbitacin I-Glucosid erwartungsgemäß massenspektrometrischen Untersuchungen noch schwieriger zugänglich als dies bei Elaterinid aufgezeigt wurde (siehe Seite 76 f.).

In den FD-Massenspektren erschienen interpretierbare Peaks bei Massenzahlen von 1028 (Aglykon-Aglykon), 681 (M^+ +23 - 1 H_2O) und 498 (Aglykon - 1 H_2O + 2 H) (100%-Peaks bei 130 bzw. 44).

Die Reinigung der Desacetyl-Elaterinid-Präparate von öligen, gelben Verunreinigungen und dem chromatographisch schwer abtrennbaren Glucosid des Cucurbitacins L erwies sich als äußerst schwierig und war mit großem Substanzverlust verbunden. Wir mußten uns schließlich damit begnügen, die Prüfung mit noch etwas verunreinigten Substanzen vorzunehmen. Erkennbar wird das an den relativ niedrigen Extinktionskoeffizienten

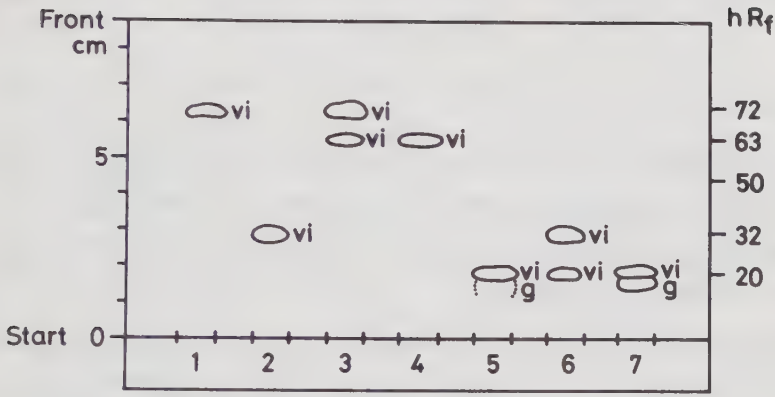


Abb. 31 : Dc-Vergleich von Cucurbitacin E und Elaterinid mit ihren Desacetyl-Derivaten

Schicht: Kieselgel F_{254}-Fertigfolie

Fließmittel: Chloroform-Äthanol (85 + 15)
System IIa

Anfärbung: Vanillin-Schwefelsäure
g = gelb, vi = violett

1 = Cucurbitacin E
2 = Elaterinid
3 = Cucurbitacin E, nach alkal. Hydrolyse (1 d)
4 = Cucurbitacin I
5 = Desacetyl-Elaterinid
6 = Elaterinid, nach alkal. Hydrolyse (1 d)
7 = Glykosidgemisch aus den unterirdischen Teilen von
G r a t i o l a

($\varepsilon_{234\ nm} < 10\ 000$) im UV-Spektrum und der relativ geringen Differenz der molekularen Drehungen von Glucosid und Aglykon (im Vergleich zu den bei Elaterinid ermittelten Werten).
Der Reinheitsgrad der beiden Präparate ist aus dem Dünnschichtchromatogramm (Abb. 26) auf Seite 80 ersichtlich.

c) Cucurbitacin L - Glucosid

Die zunächst als "Glykosid b" bezeichnete Substanz (s. Seite 7[illegible] konnte nur in geringen Mengen (2 mg) und nicht kristallin erhalten werden; wir mußten uns daher auf eine chromatographische Identifizierung beschränken.

Bei der DC in den Systemen IIa, III, V und XI (siehe 9.3.3.3.) zeigte "Glykosid b" stets geringfügig niedrigere R_f-Werte als Desacetyl-Elaterinid. Die Fluoreszenzlöschung bei 254 nm auf Kieselgel GF_{254}-Platten war relativ schwach. Mit Eisen-III-chlorid-Reagenz waren die entsprechenden Substanzzonen nicht anfärbbar, mit dem Vanillin-Phosphorsäure- und dem Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz erschienen sie gelb. Nach enzymatischer Spaltung mit einem ß-Glucosidase-Präparat konnten Cucurbitacin L und Glucose in direktem chromatographischen Vergleich mit authentischen Substanzen nachgewiesen werden.

Auf Grund der chromatographischen Eigenschaften und der nachgewiesenen Spaltprodukte sehen wir "Glykosid b" daher, in Analogie zu Elaterinid und Desacetyl-Elaterinid, als das 2-O-ß-D-Glucosid des Cucurbitacins L (Strukturformel s. Abb. 2, Seite 11) an (= 23,24-Dihydro-desacetyl-elaterinid). Über ein Vorkommen dieser Verbindung in G r a t i o l a lagen bisher noch keine Angaben vor.

4.3.4. Zur Konstitution des Gratiotoxins

Nachdem sowohl die phytochemischen (siehe 4.2.) als auch orientierende pharmakologische Untersuchungen (siehe 7.) keine Hinweise auf Cardenolide in G r a t i o l a erbracht hatten, mußte unserer Meinung nach die von KRUG (1934) als "Gratiotoxin" bezeichnete cardiotoxische Substanz (vgl. Seite 8) unter den Cucurbitacinglykosiden zu suchen sein.

KRUG (1934) hatte Gratiotoxin gewonnen, indem er aus der Droge ein wäßriges Mazerat herstellte, dieses (nach Entfernung der Ballaststoffe durch Bleifällung) mit Chloroform extrahierte und den Chloroform-Auszug mit Äther und Petroläther versetzte; dabei fiel das Gratiotoxin als amorphes Pulver aus.

Auf die gleiche Art und Weise können aber auch Cucurbitacinglykoside isoliert werden (vgl. Seite 69). Im übrigen hatten wir die G r a t i o l a - Droge ja auf ähnlichem Wege extrahiert und die Extrakte entsprechend aufgearbeitet (siehe 9.3.1.); daher nahmen wir an, daß der Extrakt E I etwa die gleiche Zusammensetzung besitzen müßte wie der von KRUG (1934) hergestellte Chloroform-Auszug. Wir versetzten daher eine konzentrierte Lösung des Extraktes E I in Chloroform mit Äther/Petroläther und beobachteten dabei, wie von KRUG (1934) beschrieben, die Abscheidung einer harzähnlichen Masse an der Kolbenwandung und eine feinflockige Ausfällung. Nach mehrfacher Wiederholung des Vorganges erhielten wir schließlich eine Substanz, die in allen Kriterien dem aus Koloquinthen isolierten Elaterinid entsprach (vgl. Seite 71 f.); nach den bisher durchgeführten chromatographischen Untersuchungen (siehe 4.3.2.) war dies auch zu erwarten.

Wir sind daher der Meinung, daß Gratiotoxin und Elaterinid identisch sind. Gestützt wird diese Annahme vor allem durch einen Vergleich der Schmelztemperaturen von Elaterinid (162 °C) und Gratiotoxin (165 °C). Für eine Identität der beiden Substanzen sprechen auch folgende Befunde KRUGs, die mit unseren eigenen Beobachtungen übereinstimmen: Zur säurehydrolytischen Spaltung des Glykosides ist ein längeres Erhitzen notwendig (vgl. Seite 72); man erhält dabei einen Fehlingsche Lösung reduzierenden Zucker (Glucose).

Zur weiteren Absicherung führten wir noch einige der von KRUG (1934) für Gratiotoxin beschriebenen Mikrofarbreaktionen durch, sowie zusätzlich einige Nachweisreaktionen auf Cardenolide (vgl. 4.2.): Mit Molybdatophosphorsäurelösung trat bei Elaterinid wie bei Gratiotoxin eine Grünfärbung auf, die auf Zusatz von Ammoniaklösung in Blau umschlug ("TRAPPsche Probe" für Digitalinum verum, nach KRUG 1934; allgem. Probe auf reduzierende Substanzen, nach FEIGL 1960). In konzentrierter Schwefelsäure zeigen sowohl Elaterinid als auch Gratiotoxin eine rote Färbung (vgl. Seite 30). Ebenfalls der KRUGschen Beschreibung entsprach der Ausfall der Reaktion mit Vanillin-Kristallen und konz. Schwefelsäure. Demgegenüber erwähnt KRUG (1934) hinsichtlich des Ausfalls der KELLER-KILIANI-Probe nur, daß sie negativ ausfiel. - Einen vergleichenden Überblick über die Eigenschaften der beiden Substanzen gibt die Tabelle 6.

Tab. 6 : Vergleich einiger Eigenschaften von Elaterinid und Gratiotoxin

(Ausführung der Farbreaktionen nach KRUG 1934, bzw. WICHTL 1971)

	Elaterinid	Gratiotoxin
Schmelzpunkt	162 °C	165 °C
"TRAPPsche Probe"	+	+
Subst. + konz. H_2SO_4	rötl., später rot	rötl., später rot
" + konz. H_2SO_4 + Vanillin-Krist.	bräunl., mit grünem Rand, dann grün	bräunl. mit grünem Rand, dann grün
Rkt. nach PESEZ-DEQUEKER	gelb	-
Xanthydrol-Reaktion	braun-rot	-
KEDDE-Reaktion	rötlich braun	-
KELLER-KILIANI-Reaktion	rot-brauner Ring, Überstand grün	negativ

4.4. Andere Inhaltsstoffe

a) "Fraktionen 93 - 104"

Aus den Fraktionen 93 - 104 (SC 5; s. Abb. 20, Seite 70) erhielt man etwa ein Gramm eines gelb-braunen Pulvers von zuerst brennendem, dann intensiv bitterem Geschmack. Die dc-Überprüfung im System III (siehe 9.3.3.3.) zeigte zwei Hauptflecken mit praktisch gleichen Laufstrecken wie Desacetyl-Elaterinid und Cucurbitacin L-Glucosid. Beide Zonen waren mit Vanillin-Schwefelsäure violett anfärbbar und ergaben mit LIEBERMANN-BURCHARD-Reagenz eine braun-violette Färbung (s. Exp. Teil).

Da nach diesen Befunden weitere Cucurbitacinglykoside zu erwarten waren (vgl. auch Seite 62 f), nahmen wir mit dem Fraktionsrückstand der Fraktionen 93 - 104 einige Versuche zur Identifizierung der darin enthaltenen Substanzen vor; über die dabei erhaltenen Ergebnisse möchte ich hier kurz berichten:

Durch Einwirkung von Cellulase konnte man beide Substanzen spalten; Glucose wurde in üblicher Weise nachgewiesen (s. Exp. Teil). Die mit Chloroform aus dem Reaktionsansatz extrahierten glucose-ärmeren Verbindungen (= Aglyka) waren im Dünnschichtchromatogramm als zwei fluoreszenz-löschende Substanzzonen mit $hR_{Cuc.\ L}$-Werten von 94 und 76 (System III) auszumachen.

Das Aglykon mit dem höheren hR_x-Wert zeigte eine negative $FeCl_3$-Reaktion; dies war als Hinweis auf ein Cucurbitacin der

Ketol-Gruppe zu werten. In der Tat zeigte die Verbindung in den Systemen I, Ia, III und IX gleiches Laufverhalten wie Cucurbitacin A, ein Vertreter der letztgenannten Gruppe (Cucurbitacin A = 1,2-Dihydro-19-hydroxy-cucurbitacin E; vgl. Abb. 2, Seite 11).

Nach Acetylierung (siehe 9.3.5.) erwies sich jedoch, daß die Substanz aus G r a t i o l a und Cucurbitacin A nicht identisch sein konnten, da die R_f-Werte der unter gleichen Bedingungen erhaltenen Acetylierungsprodukte im System IX unterschiedlich waren. Möglicherweise handelt es sich bei dem unbekannten Aglykon um Cucurbitacin D, das 1,2-Dihydro-derivat des Cucurbitacins I, das in den verwendeten Systemen gleiche $hR_{Cuc.\ L^-}$ Werte wie Cucurbitacin A aufweisen soll (MACEK 1972).

Die zweite aus dem fermentierten Gemisch erhaltene, $FeCl_3$-positive Substanz wurde in geringen Mengen durch präparative DC isoliert. Unsere Vermutung, es könnte sich dabei um eines der isomeren Cucurbitacine J oder K (=24-Hydroxy-cucurbitacin L; vgl. Abb. 2, Seite 11) handeln, ließ sich aber nicht bestätigen. Vielmehr konnte man aus der Lage der Maxima im UV-Absorptionsspektrum (s. Tab. 7) schließen, daß es sich dabei mit einiger Wahrscheinlichkeit um ein 2,3-Dihydroflavonol (vermutlich mit freier 7-OH-Gruppe und vicinalen Hydroxylgruppen im B-Ring) handelte (Interpretation nach MABRY u. Mitarb. 1970).

Tab. 7 : Spektrale Daten des $FeCl_3$-positiven Aglykons (UV).

Lösungsmittel	$\lambda_{max.}$ [nm]
Methanol	230 sh, 275, 310 sh
" + $AlCl_3$	237, 270 sh, 318, 357
" + NaOMe	(230 sh), 275, (330 sh) (dec.)
" + NaOAc	247, 293, (330 sh)
" " + H_3BO_3	230 sh, 275, 315 sh

Weitere Untersuchungen wurden mit diesen Substanzen nicht vorgenommen.

b) "F 25"

Aus dem öligen Rückstand der Fraktionen 25 und 26 (SC 5; s. Abb. 20, Seite 70) kristallisierte nach mehreren Wochen eine Substanz ("F 25") aus (s. Abb. 32), die nach Waschen mit Aceton und Äthylacetat und mehrfachem Umkristallisieren aus Chloroform-Methanol-Mischungen in einer Ausbeute von etwa 10 mg chromatographisch einheitlich gewonnen werden konnte (s. Exp. Teil). Nach DC in den Systemen I (hR_f = 7), Ia (hR_f = 12) und III (hR_f = 44) zeigten die entsprechenden Zonen, mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz besprüht, eine orange-gelbe Farbe, mit KEDDE-Reagenz reagierten sie rot-violett.

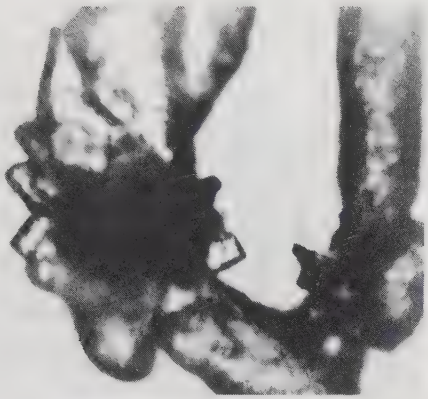


Abb. 32 : Kristalle von "F 25" (Vergrößerung ca. 400fach)

Der Schmelzpunkt der Substanz war scharf und lag bei 191 °C. Das UV-Absorptionsspektrum (s. Abb. 33) zeigte Maxima bei Wellenlängen von 208 nm ($\varepsilon_{\%} \sim 400$), 220 nm (sh; $\varepsilon_{\%} \sim 200$), 275 nm ($\varepsilon_{\%} \sim 40$) und 282 nm (sh). Es entsprach damit den Spektren der Substanzen, die wir auf der Suche nach Cardenoliden vermessen hatten (siehe S. 53). - Zu unserer Überraschung enthielt "F 25" Stickstoff im Molekül (positive "Kalkprobe" nach FEIGL 1960), ließ sich jedoch auf DC-Platten nicht mit DRAGENDORFF's Reagenz (siehe 9.3.3.1.) anfärben.

Im IR-Spektrum (s. Abb. 34) fallen zwei Banden bei 3200 cm^{-1} und 3120 cm^{-1} auf, die zusammen mit der starken Bande bei 1690 cm^{-1} und einer weiteren bei 1470 cm^{-1} für das Vorliegen einer R-CO-NHR-Gruppierung sprechen (BELLAMY 1966).

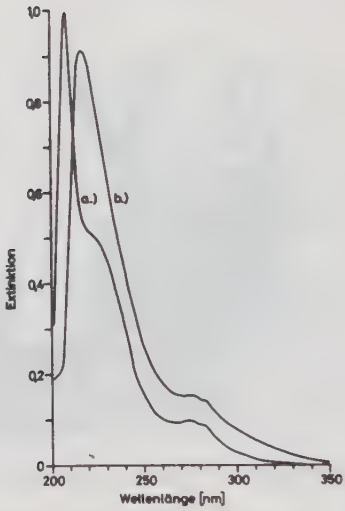


Abb. 33 : UV-Absorptionsspektrum von "F 25"
a) in Methanol (c = 2,5 mg/100 ml)
b) in methanol. NaOH

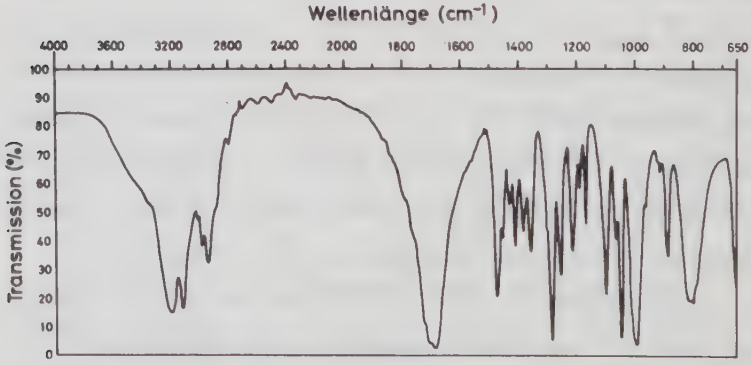


Abb. 34 : IR-Spektrum von "F 25" (in KBr)

Im EI-Massenspektrum (s. Abb. 35) entfällt etwa ein Drittel der gesamten Ionenintensitäten auf einen Peak bei m/e 84, während der obere Massenbereich auffallend leer ist. - Ein solches Fragmentierungsverhalten, das von der "lokalisierten Ladung" (BUDZIKIEWICZ 1972) am Heteroatom bestimmt wird, zeigen nach BIEMANN (1966) Steroidalkaloide, bzw. gesättigte, stickstoffhaltige Steroidderivate. Das Vorliegen eines Steroidalkaloides kann jedoch ausgeschlossen werden, da "F 25" weder mit dem Reagenz nach DRAGENDORFF noch mit dem Reagenz nach LIEBERMANN-BURCHARD positiv reagierte.

Als schwierig erwiesen sich die Versuche, mit Hilfe der Massenspektrometrie das Molekulargewicht von "F 25" zu bestimmen. Im 70 eV-Spektrum (s. Abb. 35) war der Peak mit der höchsten Massenzahl m/e 166, bei 38 eV m/e 140 und bei 12 eV ebenfalls m/e 140. Während das 38 eV-Spektrum noch weitgehend in den aufgetretenen Fragmenten dem 70 eV-Spektrum entsprach, reduzierten sich die Fragmente im 12 eV-Spektrum auf m/e 140 (rel. Int.: 70 %), 84 (100 %) und 83 (52 %).

In den unter verschiedenen Bedingungen aufgenommenen FD-Massenspektren (siehe 9.3.7.) schließlich war die höchste reproduzierbare Masse 250. Peaks höherer Intensitäten erschienen regelmäßig bei Massenzahlen von 185 und 84; letztere Massenzahl ergab hier, ebenso wie in den EI-Massenspektren, immer den Basispeak.

"F 25" war sowohl dc auf Grund seiner charakteristischen Färbung mit Vanillin-Schwefelsäure als auch gc (siehe 9.3.3.5.) mittels eines stickstoffselektiven Detektors im Gesamtextrakt E II_H nachweisbar (s. Abb. 36).

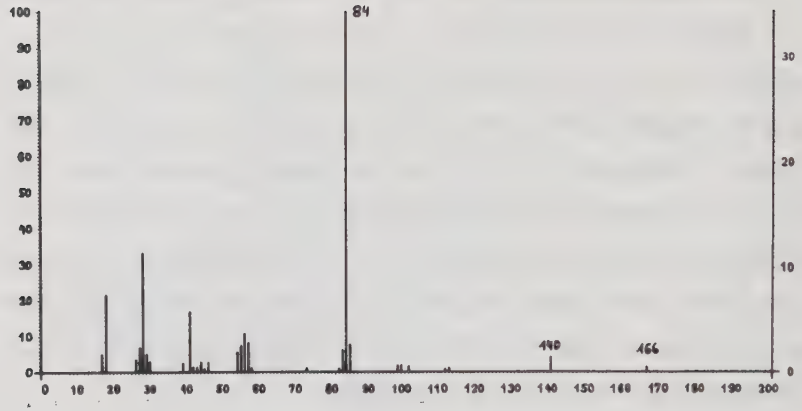


Abb. 35 : EI-Massenspektrum von "F 25" (70 eV)

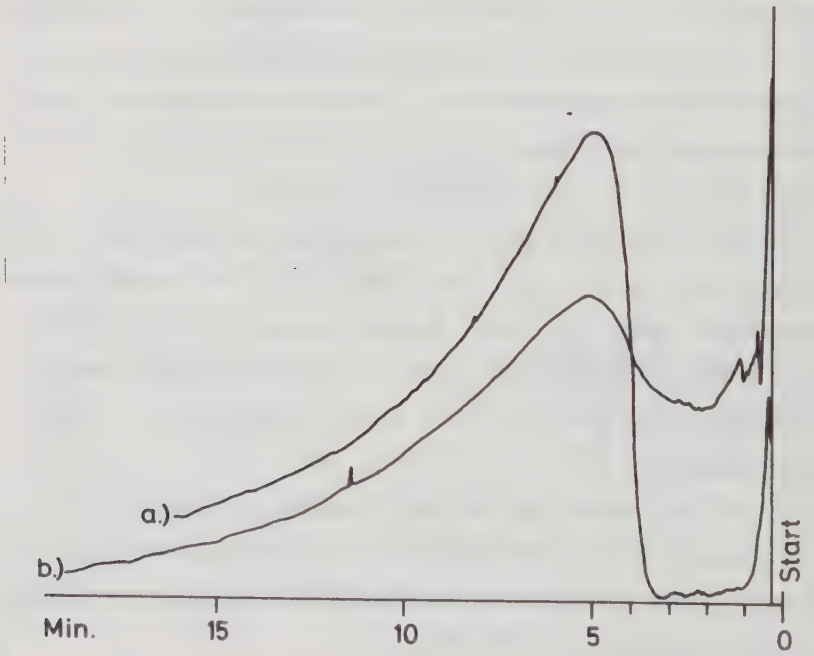


Abb. 36 : Gaschromatogramm von "F 25" (a) und "E II_H" (b) (SE 30, 180 °C, PND; siehe 9.3.3.5.)

Die S c r o p h u l a r i a c e e n waren lange Zeit als alkaloidfreie Pflanzenfamilie angesehen worden. Inzwischen fand man jedoch in einer ganzen Reihe von Gattungen Stickstoff-haltige Verbindungen, die vorwiegend terpenoiden Ursprungs sind (HEGNAUER 1973). Neben Monoterpen-Alkaloiden mit Pyridin- oder Piperidin-Struktur kommen aber auch vereinzelt Spermin-Alkaloide (BOSSHARDT u. Mitarb. 1976), Indol-Derivate sowie Verbindungen mit Chinazolin- und Chinolizidin-Grundkörper vor (RAFFAUF 1970).

Durch einen Vergleich der von "F 25" ermittelten spektroskopischen Daten mit jenen, die im "MANSKE" (MANSKE 1960-1977) und anderen Standardwerken sowie in Original-Arbeiten publiziert sind (SCOTT 1964; BUDZIKIEWICZ u. Mitarb. 1964; SANGSTER, STUART 1965; SPITELLER 1966; KRAFT 1975; ROTHER, SCHWARTING 1978; HESSE 1978) konnte die Identität von "F 25" zwar nicht festgestellt werden; gewisse Anzeichen sprechen jedoch für das Vorliegen eines Chinolizidin-Grundkörpers: IR-Absorption bei 2800 cm^{-1} ("trans-Bande"). Maxima im UV zwischen 200 nm und 220 nm, molare Extinktionskoeffizienten von 5000 bis 10 000 (bei einem angenommenen Molekulargewicht von 250) (Lit. s.o.).

Vermutlich enthält das Molekül zwei Stickstoffatome, von denen eines Teil einer Amid-Gruppierung ist (IR, s.o.) sowie möglicherweise einen aromatischen Rest (UV: Maxima bei 275 - 282 nm; IR: 3020 cm^{-1}, 790 - 820 cm^{-1}).

Weitere Untersuchungen konnten leider aus Substanzmangel nicht mehr durchgeführt werden.

4.5. Diskussion der in Abschnitt 4 erhaltenen Ergebnisse

Die voranstehend beschriebenen Untersuchungen haben gezeigt, daß Cardenolide in G r a t i o l a mit einiger Sicherheit nicht vorhanden sind. Der positive Ausfall einiger Farbreaktionen auf Cardenolide ist mit der Anwesenheit der Cucurbitacine erklärbar. Das von KRUG (1934) als Cardenolid angesehene Gratiotoxin ist höchstwahrscheinlich mit Elaterinid, dem Glucosid des Cucurbitacins E, identisch. - Die bei der DC festgestellten KEDDE-positiven Substanzen sind wohl allenfalls nur Verbindungen mit aktiven Methylengruppen. Für eine dieser Verbindungen erbrachte man den Nachweis, daß sie kein Cardenolid darstellte sondern eine Stickstoff-haltige Verbindung, für die die Struktur eines Chinolizidin-Alkaloides in Betracht gezogen wird.

Als Hauptinhaltsstoffe von G r a t i o l a sind die Cucurbitacinglykoside anzusehen, von denen wir Desacetyl-Elaterinid erstmalig charakterisierten. Des weiteren wurde zum ersten Mal über das Vorkommen von Cucurbitacin L -Glucosid in G r a t i o l berichtet. Gleichzeitig konnten die Angaben von TSCHESCHE u. Mitarb. (1964) über das Vorliegen von Cucurbitacin L bestätigt werden. Die in dieser Hinsicht negativen Befunde GMELINs (1967) haben ihre Ursache im Erntezeitpunkt des Untersuchungsmaterials (Anfang Juni), bzw. sind auf die Verwendung von Frischmaterial zurückzuführen; in der Seitenkette hydrierte Cucurbitacine treten offenbar erst später im Jahr, bzw. erst nach längerer Lagerung der Droge auf (vgl. 6).

Ähnlich widersprüchliche Angaben über das Vorkommen von bestimmten Cucurbitacinen gab es auch im Falle der Gattung B r y o n i a , wo POHLMANN (1974) dann die Abhängigkeit des Cucurbitacinspektrums von Erntezeitpunkt und Lagerung nachwies. Daher erschienen mir auch für G r a t i o l a derartige Untersuchungen notwendig, über deren Ergebnisse ich in den beiden nächsten Abschnitten berichten möchte.

5. Quantitative Bestimmungsmethoden

5.1. Problemstellung

Das neuerdings zu beobachtende verstärkte Interesse an Cucurbitacinen (DREYER u. Mitarb. 1978; KUPCHAN u. Mitarb. 1978), die Bedeutung cucurbitacinhaltiger Tinkturen in der Homöopathie (z.B. I b e r i s bei Herzerkrankungen, L u f f a bei Heuschnupfen) und das unerwünschte Auftreten von Cucurbitacinen in Nahrungsmitteln (z.B. als Ursache des bisweilen bitteren Geschmacks von Gurken; siehe dazu auch HERRMANN 1977) lassen es wünschenswert erscheinen, daß für diese Stoffe eine geeignete quantitative Bestimmungsmethode zur Verfügung steht. Auch für unser Vorhaben, Veränderungen des Cucurbitacin-Gehaltes während der Vegetationsperiode von G r a t i o l a zu untersuchen, war eine solche Methode, die zumindest die Bestimmung der Cucurbitacine E und I sowie ihrer Glykoside erlaubte, notwendig.

Über quantitative Cucurbitacin-Bestimmungen liegen bisher folgende Arbeiten vor: REHM (1960) führte eine grob quantitative Bestimmung aufgrund der Fleckgrößen und Farbintensitäten nach Besprühen von Papierchromatogrammen durch; DARWISH-SAYED u. Mitarb. (1974) bestimmten den Gehalt an Cucurbitacin E und Elaterinid spektrophotometrisch nach DC-Trennung, Elution und Farbbildung (mit Natriummethylat) bei 420 nm.

Um auch einen größeren Analysenanfall ohne allzu großen Zeitaufwand bewältigen zu können, strebten wir die Entwicklung einer direkten Bestimmungsmethode an. Da die Cucurbitacine allesamt ein Absorptionsmaximum bei 230 nm aufweisen, gingen

wir davon aus, daß diese Verbindungen einer Bestimmung durch "in situ"-Remissionsmessung auf der DC-Platte zugänglich sind.

5.2. Quantitative Bestimmung der Cucurbitacine durch Remissionsmessung

Nach Auftrennung der Extrakte (zur Herstellung derselben siehe 9.6.1.) im System III (auf Kieselgel 60 F_{254}-Fertigplatten) bestimmte man die Cucurbitacine E und I sowie Elaterinid durch in situ-Messung der Remission bei maximaler Absorption der Substanzen im Bereich um 230 nm (s. Exp. Teil). - Als Vorteil dieser "gemischten Messung" (gleichzeitige Remission und Fluoreszenzminderung) ist die zusätzliche visuelle Kontrolle der Chromatographie anzusehen.

Die Auswertung der Remissionsgradortskurven erfolgte über die Peakhöhen. Im Falle der Aglyka besteht etwa von 0,1 µg bis 1,5 µg Substanz pro Fleck Linearität zwischen Peakhöhe und Konzentration, im Falle von Elaterinid etwa zwischen 0,5 µg und 3 µg (zu Auftrageverfahren und Auswertemethoden vgl. HEROLD 1975; chromatographische Parameter und Densitometerdaten siehe 9.6.3.).

Vorwiegend aus finanziellen Erwägungen (Kosten der Fertigplatten!) mußten wir für diese Bestimmungen eine Reihe von Kompromissen zwischen Aufwand und erzielbarer Genauigkeit ins Auge fassen, die ich kurz erläutern möchte:

Zum Ersten mußten sowohl Aglyka als auch Glykoside in einem System getrennt werden können. Diesen Anforderungen entsprach

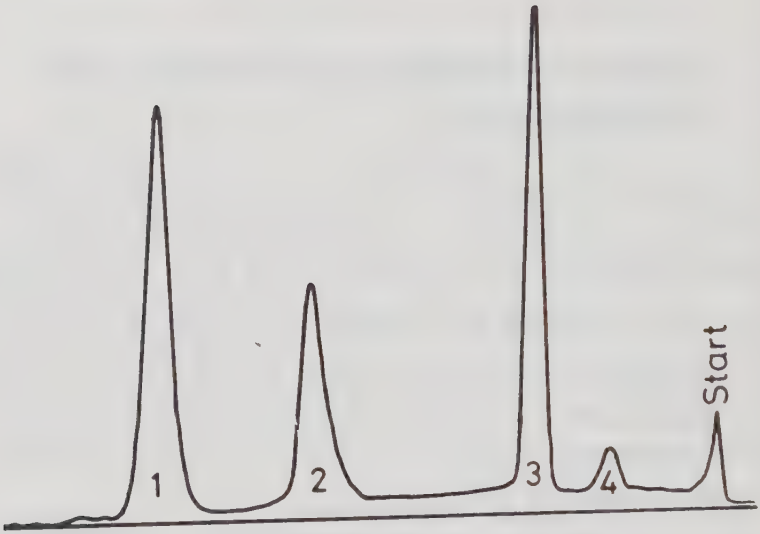


Abb. 37 : Remissionsortskurve eines Cucurbitacin-Gemisches (230 nm; Zweistrahl, R 0,4).
1 = Cucurbitacin E (1,5 µg/2 µl)
2 = Cucurbitacin I (1,0 µg/2 µl)
3 = Elaterinid (3,0 µg/2 µl)
4 = Desacetyl-Elaterinid

System III, das aber andererseits auch einige Nachteile aufweist: Einmal ist eine Trennung der Cucurbitacine I und L, die eine Auswertung mit dem zur Verfügung stehenden Densitometer (SCHOEFFEL SD 3000) ermöglichen würde, damit nicht erreichbar; zum anderen kommt es zur Ausbildung von ß-Fronten, die zur Deformation der Fleckformen vor allem von Elaterinid

führen können. Diese Schwierigkeiten kommen in der Abbildung 37, die die Remissionsortskurve einer Mischung von Cucurbitacin E, I, Elaterinid und Desacetyl-Elaterinid nach Trennung in System III zeigt, allerdings nicht zum Ausdruck.

Tab. 8 : Reproduzierbarkeit der Cucurbitacin E-Bestimmung durch Remissionsmessung - Auswertung über Peakhöhe

Platte	µg Cucurbitacin E / 2 µl	
	mit Plattenstandard	mit Eichgerade
1	2	3
1	1,46	1,74
	1,46	1,74
2	1,46	1,46
	1,49	1,49
3	1,50	1,41
	1,49	1,40
4	1,33	1,80
	1,33	1,79
5	1,53	1,60
	1,55	1,62
	$\bar{x}$ = 1,46	$\bar{x}$ = 1,61
	s = 0,08	s = 0,15
	s_{rel} = 5,6	s_{rel} = 9,5

Alle Werte nach Rechnung gerundet.

Tab. 9 : Reproduzierbarkeit der Cucurbitacin I-Bestimmung durch Remissionsmessung - Auswertung über Peakhöhe

Platte	µg Cucurbitacin I / 2 µl	
	mit Plattenstandard	mit Eichgerade
1	2	3
1	0,89	0,95
	0,86	0,91
2	0,86	0,83
	0,89	0,85
3	1,00	0,89
	0,92	0,80
4	0,82	0,84
	1,06	1,09
5	1,00	0,92
	1,09	1,00
	$\bar{x}$ = 0,94	$\bar{x}$ = 0,91
	s = 0,09	s = 0,09
	s_{rel} = 9,8	s_{rel} = 9,7

Alle Werte nach Rechnung gerundet.

Tab. 10 : Reproduzierbarkeit der Elaterinid-Bestimmung durch Remissionsmessung - Auswertung über Peakhöhe

Platte	µg Elaterinid / 2 µl mit Plattenstandard	mit Eichgerade
1	2	3
1	2,93	2,80
	2,83	2,70
2	3,10	3,40
	3,00	3,30
3	3,00	2,50
	3,45	2,80
4	2,85	3,20
	2,75	3,10
5	3,30	3,05
	3,25	3,00
	$\bar{x}$ = 3,05	$\bar{x}$ = 2,99
	s = 0,23	s = 0,28
	s_{rel} = 7,4	s_{rel} = 9,5

Zum Zweiten war es nicht möglich, bei jeder Bestimmung für jede Platte eine neue Eichgerade aufzustellen. Wie die Tabellen 8, 9 und 10 jedoch zeigen, bestanden keine (signifikanten) Unterschiede (t-Test, F-Test; KAISER, GOTTSCHALK 1972) zwischen den Werten, die einerseits mit jeweils einer Eichgeraden pro Platte (Plattenstandard, Spalte 2) und andererseits mit einer einmalig aus zehn Bestimmungen ermittelten Eichgeraden (Spalte 3) erhalten wurden. Die ermittelten relativen Standardabweichungen (s_{rel}) waren zwar vergleichsweise hoch, für die geplanten Untersuchungen über die Änderungen des relativen Cucurbitacin-Gehaltes in G r a t i o l a unserer Meinung nach jedoch tolerierbar. - Bei diesen Untersuchungen (vgl. 6.2.) kamen als weitere Schwierigkeiten hinzu, daß einmal die Konzentrationen der einzelnen zu bestimmenden Substanzen stark, zum Teil um eine Zehnerpotenz, auseinander lagen und daher mindestens drei Verdünnungen einer Stammlösung zu chromatographieren waren; zum anderen zeigten sich während der Vegetationsperiode auch Veränderungen in den Begleitstoffen, die sich auch auf die Trennung auswirkten. Zur Illustration dieser Schwierigkeiten sind in der Abbildung 38 die Remissionsortskurven von Frischpflanzen- und Drogenauszügen der 4. Ernte (siehe 6.) angeführt, die die Unterschiede in den Zusammensetzungen und Konzentrationen deutlich werden lassen.

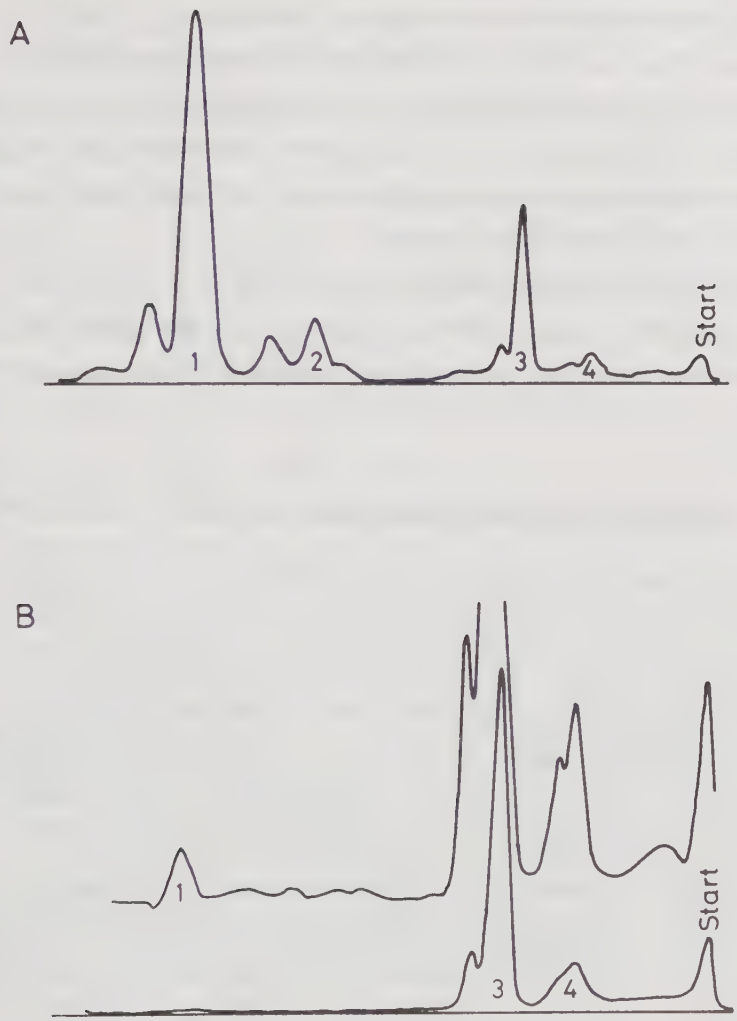


Abb. 38 : Remissionsortskurven der Chloroform-Stammlösungen (Aufnahmebedingungen siehe Exp. Teil; vgl. Abb. 37, S. 102)

A) 4. Ernte 1976; Frischpflanzen (12,5 g/5 ml, davon 2 µl)

B) dto. ; Droge (3 g/5 ml; davon 2 µl), oben
(3 g/25 ml; davon 2 µl), unten

Die beschriebene Methode kann als Grundlage für die Bestimmung von Cucurbitacinen in Drogen und homöopathischen Zubereitungen dienen. Eine Optimierung der Bedingungen müßte dabei, abhängig von den Gegebenheiten des jeweiligen Extraktes und des zu bestimmenden Cucurbitacins, für jeden Fall und spezielle Aufgabenstellung vorgenommen werden.

Gratiogenin-Derivate lassen sich mit dieser Methode nicht erfassen. Das hat den Vorteil, daß eine Abtrennung nicht erfolgen muß. Über Möglichkeiten zur Gratiosid-Bestimmung siehe 5.3.

5.3. Indirekte spektralphotometrische Bestimmung von Gratiosid

Gratiogenin-Derivate weisen im UV-Spektrum lediglich ein schwaches Maximum bei 290 nm ($\varepsilon < 200$) auf. Sie geben sich daher erwartungsgemäß nicht durch Fluoreszenzlöschung auf Kieselgel F_{254}-Platten zu erkennen, auch können sie nicht durch Remissionsmessung erfaßt werden. Da alle von uns unternommenen Versuche fehlschlugen, die entsprechenden Substanzzonen auf den Chromatogrammen zu einer quantitativ auswertbaren Fluoreszenz anzuregen (z.B. durch Einstellen in HCl-Dämpfe oder Tauchen in Schwefelsäure, Phosphorsäure mit und ohne Vanillin-Zusatz), mußte eine indirekte Bestimmungsmethode gesucht werden.

Versuche, durch Zugabe von konzentrierter Schwefelsäure mit und ohne Methanolzusatz eine stabile und meßbare Färbung zu erhalten, führten im Falle von Gratiosid zu keinem brauchbaren Ergebnis (bei Gratiogenin stabile Maxima bei etwa 330 nm,

395 nm und 512 nm; Lage und Intensität der Maxima abhängig vom Methanolzusatz; bei Gratiosid ist das Maximum bei 514 nm sowohl vom Grundgerüst als auch von der Zuckerkomponente abhängig; seine Intensität steigt über 24 Stunden hin an).

Erst gegen Ende der Arbeiten an dieser Dissertation gelang es schließlich ein Reagenz zu finden, welches unter bestimmten Bedingungen mit Gratiosid eine über längere Zeit stabile Färbung ergab, deren Lichtabsorption innerhalb weiter Grenzen dem LAMBERT-BEERschen Gesetz gehorcht. Es handelt sich dabei um WASICKY's Reagenz, eine Lösung von p-Dimethylaminobenzaldehyd in verdünnter Schwefelsäure.

Das Prinzip der Bestimmung von Gratiosid mit diesem Reagenz sei hier kurz beschrieben (zu Einzelheiten siehe 9.6.4.):

Man trennt zuerst den Gratiosid-haltigen Extrakt auf selbstgestrichenen Kieselgel G-Platten auf (System IV), detektiert die Substanzen durch Einstellen in eine mit Jod-Dämpfen gesättigte Kammer, markiert die Gratiosid-Zonen anhand mitchromatographierter Vergleichssubstanz, entfernt anschließend das Jod durch Erhitzen und kratzt die markierten Zonen aus. Die an das Kieselgel adsorbierte Substanz wird mit dem Reagenz unter Erwärmen eluiert und die Extinktion der gebildeten Färbung nach insgesamt 35 Minuten bei 520 nm gegen einen Blindwert gemessen.

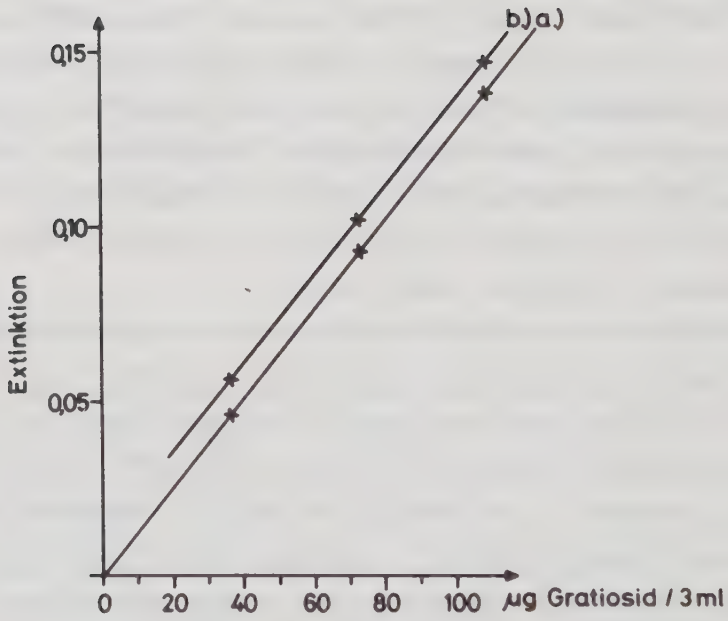


Abb. 39 : Farbreaktion von Gratiosid mit WASICKY's Reagenz - Erfüllung des LAMBERT-BEERschen Gesetzes
a) Gratiosid-Reinsubstanz
b) nach Elution von Kieselgel G-Schichten

Die Wiederfindungsrate nach dieser Methode betrug, im Vergleich zu Versuchen mit nicht an Kieselgel adsorbiertem Gratiosid, 100 - 105 Prozent. Die Extinktionen sind (im Bereich von 30 µg bis 100 µg Gratiosid) der Konzentration direkt proportional (s. Abb. 39). - Aus den Extinktionen dreier mitchromatographierter Standardkonzentrationen und den Extinktionen der Analysenlösung berechnet man dann den Gehalt an Gratiosid nach folgender Formel:

$$\mu g \text{ Gratiosid} = \frac{EA \cdot \mu g\ B}{EB}$$

(EA = Extinktion der Analysenlösung; EB = Extinktion der Standardlösung; µg B = Menge an Gratiosid in der Standardlösung).

6. Untersuchungen zur Biosynthese der Cucurbitacine

6.1. Problemstellung

Untersuchungen zur Biosynthese der Cucurbitacine wurden bisher nur innerhalb der Familie der C u c u r b i t a c e e n durchgeführt (vgl. REHM 1960; LAVIE, GLOTTER 1971). Danach soll der Cucurbitacin-Grundkörper über Parkeol entstehen. Die Variation in der Seitenkette zu den Gratiogenin-Derivaten bzw. ähnlichen Verbindungen in der Gattung B r y o n i a einerseits und den verschiedenen Cucurbitacinen andererseits erfolgt dann über epoxidische Zwischenstufen (MOSS 1966). - Als primäre Verbindungen werden die Cucurbitacine E und B angesehen.

Ausgehend von den widersprüchlichen Berichten über ein Vorkommen von Cucurbitacin L in G r a t i o l a (vgl. Seite 98) war es interessant zu untersuchen, welchen Veränderungen das Cucurbitacin-Spektrum während einer Vegetationsperiode unterworfen ist und ob sich die dabei gemachten Beobachtungen mit entsprechenden Befunden bei den C u c u r b i t a c e e n vergleichen lassen. Gleichzeitig versprachen wir uns davon Erkenntnisse über den optimalen Erntezeitpunkt sowohl zur Gewinnung von Frischpflanzenmaterial (für homöopathische Tinkturen) als auch der Droge.

6.2. Qualitative und quantitative Untersuchungen über den Cucurbitacin-Gehalt im Verlauf der Vegetationsperiode

Untersucht wurden die Veränderungen des Gehaltes an Cucurbitacin E und I sowie der Glykoside Elaterinid und Desacetyl-Elaterinid. Die Bestimmung erfolgte nach der in Abschnitt 5.2. (Seite 101) beschriebenen Methode (s.a. Exp. Teil). Desacetyl-Elaterinid wurde dabei über die Eichgerade von Elaterinid ausgewertet. - Die Ergebnisse dieser Bestimmungen sind in den Abbildungen 42 bis 45 auf den folgenden Seiten dargestellt. Die Bezeichnungen der Entwicklungsstadien, die in diesen Abbildungen verwendet werden, sind in Tabelle 11 erläutert.

Abb. 40 : G r a t i o l a - Sprosse im Entwicklungszustand a1 (Anfang Mai)

Tab. 11 : Bezeichnungen für den Entwicklungszustand des Pflanzenmaterials (nach KNAPP 1971)

Sprosse und Blätter

a1 = austreibend (vom Beginn des Austreibens bis zum Erreichen von 20 % der optimalen Größe in der betr. Vegetationsperiode) Abb. 40.

a2 = austreibend (zwischen 20 u. 60 % der optimalen Größe): Abb. 4

n = weitgehend "normaler" Entwicklungszustand. Dem optimalen Zustand angenäherte Größe (über 60 %).

vg = vergilbend, bzw. absterbend

to = oberirdische Organe abgestorben (bei Stauden usw.)

Knospen, Blüten und Früchte

k1 = Knospen gerade sichtbar, noch sehr klein

k2 = Knospen mittlerer Größe

k3 = große Knospen; zwischen Kelchblättern z.T. schon Kronblätter sichtbar

b1 = erste Blüten entfaltet

b2 = reichlich Blüten; noch keine Früchte

b3 = reichlich Blüten, aber bereits junge Früchte

b4 = reichlich Blüten, aber überwiegend schon fruchtend

b5 = nur noch einzelne Blüten, hauptsächlich fruchtend

f1 = junge Früchte

f2 = einzelne Früchte reif

f3 = Früchte größtenteils reif

f4 = Früchte nur noch einzeln, größtenteils abgefallen bzw. Kapseln aufgesprungen.

Abb. 41 : G r a t i o l a - Sprosse im Entwicklungszustand a2 (Ende Mai)

Mit den quantitativen Bestimmungen konnten die Veränderungen im Gehalt der Gratiogenin-Derivate und von Cucurbitacin L nicht erfaßt werden (vgl. 5.). Wie die qualitative Auswertung der Chromatogramme jedoch ergab, sind diese Verbindungen zu Beginn der Vegetationsperiode noch nicht vertreten. Erst ab etwa Mitte Juni (k3/b1) bis zum Ende der Vegetationsperiode im September ist ein stetiger Anstieg dieser Verbindungen zu verzeichnen. Dementsprechend ist der erneute Anstieg des Anteils der Desacetyl-Verbindungen (s. Abb. 45) am Gesamtgehalt im August wahrscheinlich auf einen erhöhten Gehalt nicht

Fortsetzung Seite 120

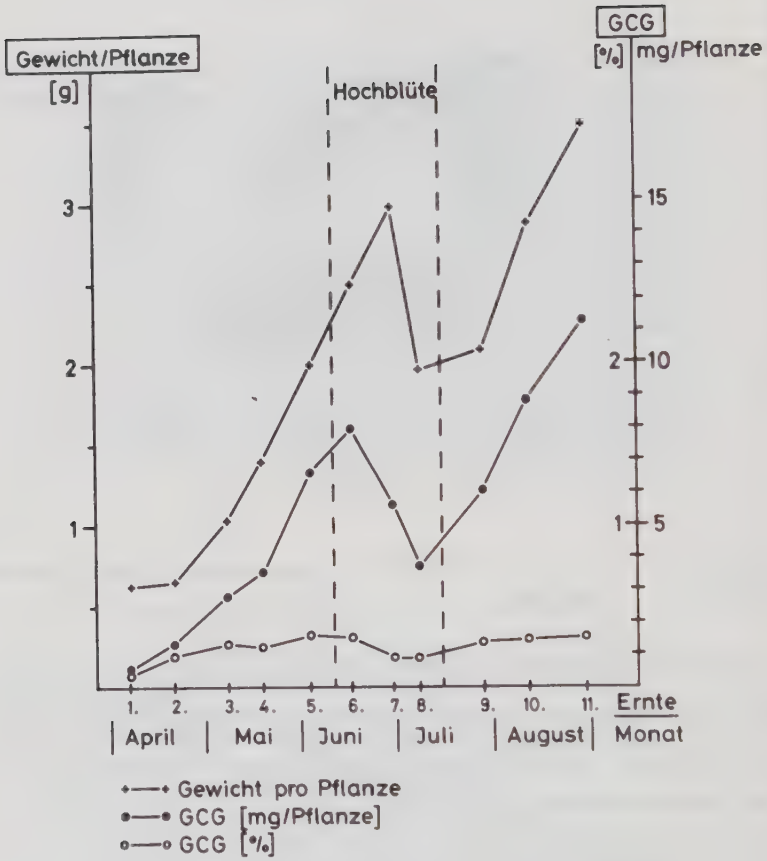


Abb. 42 : Ergebnisse der Cucurbitacinbestimmungen in Frischpflanzen (1976)

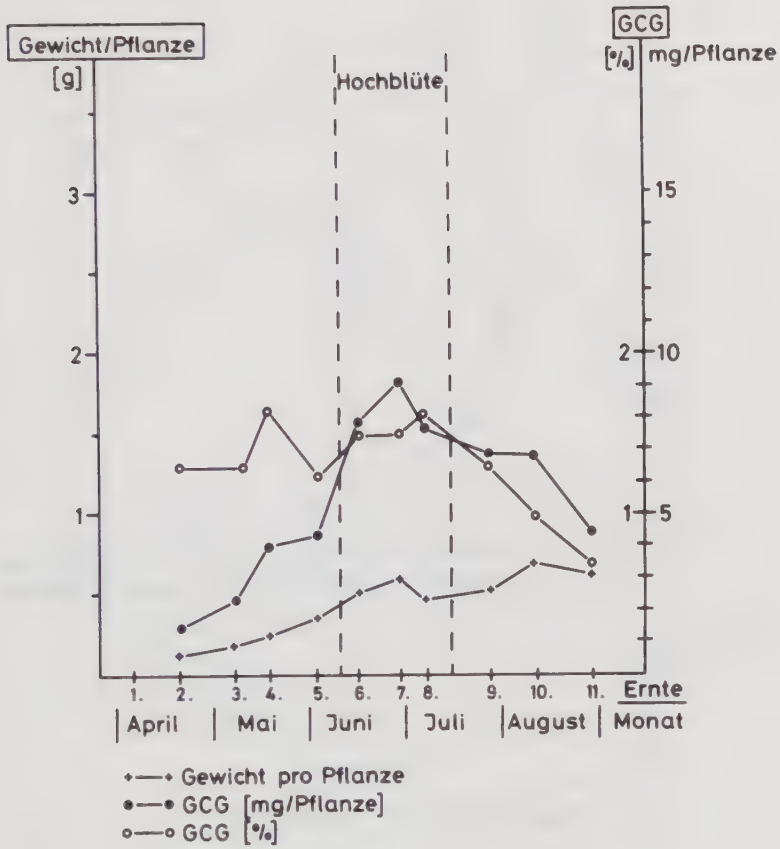


Abb. 43 : Ergebnisse der Cucurbitacinbestimmungen in getrockneten Pflanzen (1976)

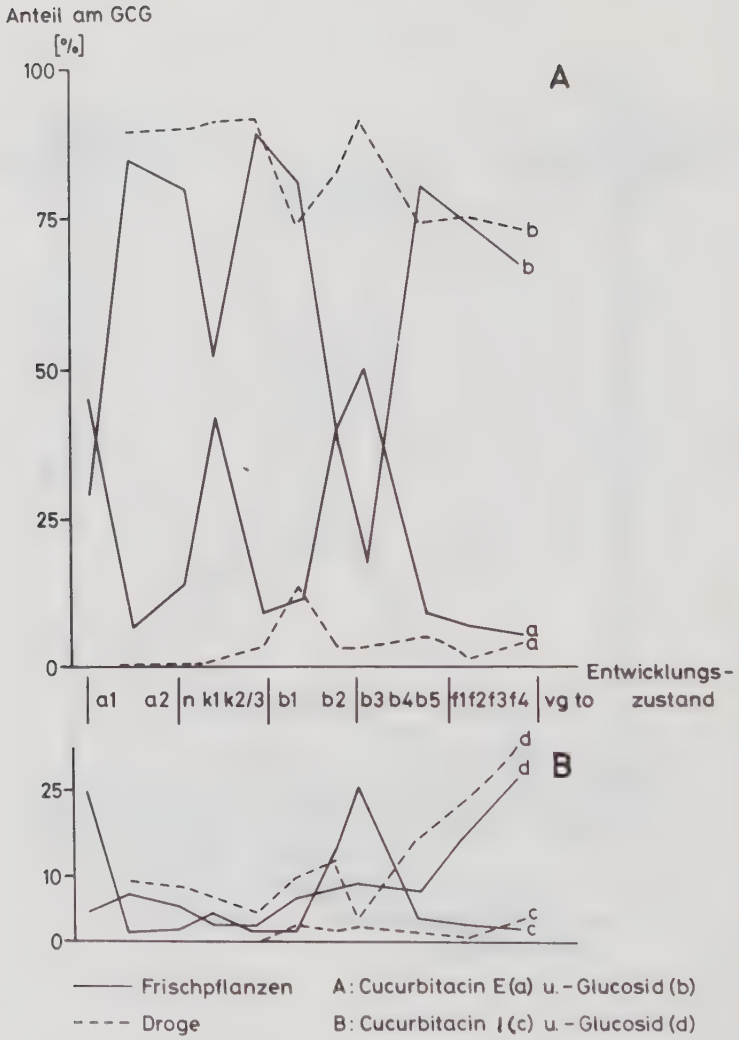


Abb. 44 : Anteil der einzelnen Substanzen am Gesamtgehalt

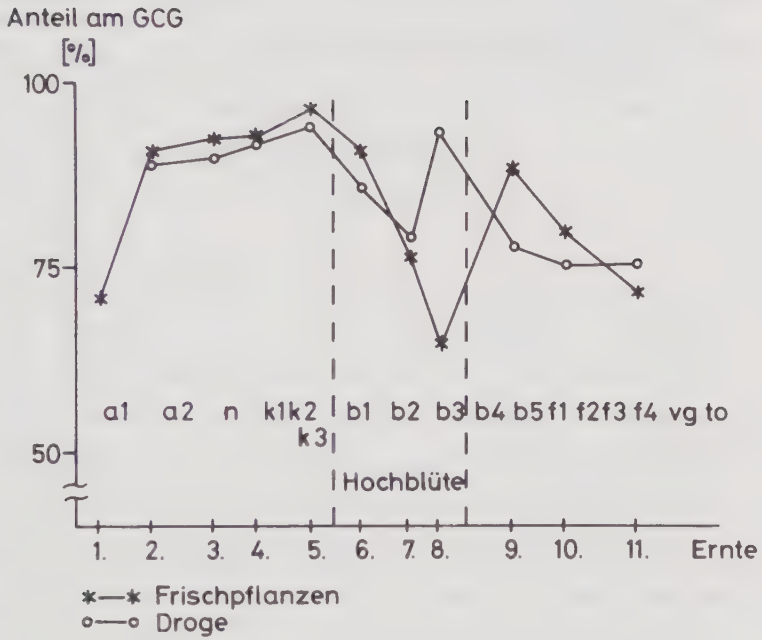


Abb. 45 : Anteil der Acetylverbindungen (Cuc. E und Elaterinid) am Gesamtgehalt

getrennt bestimmbaren Cucurbitacins L, bzw. seines Glucosides zurückzuführen. Einen etwas niedrigeren Anteil an Desacetyl-Verbindungen findet man mit 24 % in der im Oktober gewonnenen Wurzel- und Rhizom-Droge, in der der Gesamtgehalt 0,6 % beträgt und sich praktisch nur aus den Glykosiden Elaterinid und Desacetyl-Elaterinid zusammensetzt.

6.3. Untersuchungen zur Aktivität der Elaterase in Abhängigkeit vom Entwicklungszustand

Bei seinen Untersuchungen von G r a t i o l a - Frischpflanzen wies GMELIN (1967) im Preßsaft eine sehr aktive Glucosidase nach, die die in G r a t i o l a vorhandenen Cucurbitacinglykoside in kurzer Zeit in die entsprechenden Aglyka zu spalten vermochte. In gleicher Weise war das Enzym auch gegenüber den Cucurbitacinglykosiden von C i t r u l l u s c o l o c y n t h i s (L.) SCHRAD. und I b e r i s p e c t i n a t a BOISS. wirksam.

Dieses Enzym, als "Elaterase" bezeichnet, gehört dem gleichen Typ an, wie er von den südafrikanischen und israelischen Arbeitskreisen bereits aus verschiedenen Cucurbitaceen gewonnen werden konnte. Nach den Befunden von ENSLIN und REHM (1956) ist die Wirksamkeit der Elaterase nicht auf Cucurbitacinglucoside beschränkt; es lassen sich damit auch z.B. die Glucose-Reste von Cardenolid- und Bufadienolidglykosiden abspalten. Gegenüber anderen in der Herzglykosid-Chemie verwendeten Enzymen, die in der Regel einige Tage mit dem Substrat inkubiert werden müssen, haben Elaterase-Präparate offenbar höhere Wechselzahlen, so daß in etwa 24 Stunden bereits 75 Prozent und mehr an Substrat umgesetzt werden können.

Bei den Cucurbitaceen bedingt das Vorhandensein von Cucurbitacinglykosiden nicht in allen Fällen auch das Vorkommen von Elaterase. Umgekehrt zeigen cucurbitacinfreie Cucurbitaceen-Arten niemals Elaterase-Aktivität.

Bei den Arten, die Elaterase führen, sind zwei Gruppen zu unterscheiden. Bei der ersten, zu der die Gattungen C u c u m i s und L a g e n a r i a gehören, findet man die Cucurbitacine vorwiegend oder ausschließlich als Aglyka, während bei der zweiten Gruppe, der E c b a l l i u m und auch B r y o n i a zuzuordnen sind, trotz hoher Elaterase-Aktivität vorwiegend Glykoside anzutreffen sind. Bei dieser Gruppe kann die Elaterase erst nach Zerstörung der Gewebe auf die Glucoside einwirken, sie muß also in der intakten Pflanze räumlich von diesen getrennt sein (REHM 1960). Über ein Vorkommen von Elaterase in der Brassicaceen-Gattung I b e r i s ist mir nichts bekannt.

Eine eigene Nachprüfung bestätigte die Befunde von GMELIN (1967) über die Enzymaktivität eines G r a t i o l a - Preßsaftes. Dieser wurde erhalten, indem frisches blühendes Kraut mit der zehnfachen Menge Wasser homogenisiert und dann ausgepreßt wurde. Aglyka wurden zunächst durch Ausschütteln mit Chloroform quantitativ entfernt. Eine nach mehrtägiger kühler (+ 4 °C) Aufbewahrung des Preßsaftes vorgenommene dünnschichtchromatographische Überprüfung zeigte dann, daß nach dieser Zeit die Cucurbitacinglykoside fast vollständig in Zucker und Aglyka gespalten waren.

Diesem Umstand sollte bei den Untersuchungen über die ontogenetischen Veränderungen des Cucurbitacin-Spektrums (s. 6.2.) in der Weise Rechnung getragen werden, daß die Frischpflanzen nur grob zerschnitten und sofort mit heißem Alkohol übergossen wurden (s. Exp. Teil). Auf diese Art hoffte ich, eine fermentative Spaltung der Glykoside unterbinden zu können.

Wie die Ergebnisse der quantitativen Bestimmungen (s. 6.2.) jedoch zeigen, ist mir dies nicht gelungen. Bei den Aufarbeitungen wurde versucht, Temperatur und Zeit soweit möglich konstant zu halten. Dennoch kam es zu periodischen Schwankungen im Verhältnis von Aglyka zu Glykosiden, die erstaunlich gut mit dem Beginn oder dem Ende bestimmter Entwicklungsstadien korrelierten (s. Abb.44, S.118). Am stärksten zeigte sich dies in der Zeitspanne von der fünften Ernte (Anfang Juni 1976) bis zur siebenten Ernte (Anfang Juli), in der der Anteil der Aglyka am Gesamtcucurbitacin-Gehalt von ca. 10 % auf ca. 75 % anstieg.

Um ungewollte Abweichungen bei der Aufarbeitung als für diese Schwankungen verantwortlich ausschließen zu können, wurde im Jahre 1977 mit einer anderen Methode versucht, ähnliche Übereinstimmung zwischen Entwicklungszustand und erhöhter Elaterase-Aktivität, die sich unserer Meinung nach hinter den beobachteten Schwankungen verbarg, nachweisen zu können.

Aus organisatorischen Gründen mußten diese Untersuchungen auf die Zeit zwischen beginnender Hochblüte und der Fruchtreife beschränkt werden.

Auf der Suche nach einer geeigneten Methode zur Ermittlung der Enzymaktivität eines Preßsaftes wurden versuchsweise mehrere Möglichkeiten ausprobiert, wie z.B. die Bestimmung der Enzymaktivität durch fortlaufende Probenentnahmen aus dem Reaktionsansatz und anschließende quantitative Bestimmung der Spaltprodukte nach dünnschichtchromatographischer

Trennung. Am praktikabelsten erwies sich jedoch eine von REHM (1960) beschriebene Methode, die wir, nach geringfügigen Änderungen, für unsere Untersuchungen anwendeten. Diese Methode beruht im Prinzip auf der schlechteren Wasserlöslichkeit der Cucurbitacin-Aglyka gegenüber den Glykosiden. Man bestimmt die Elaterase-Aktivität durch Messen der Zeit, die nach Zugabe einer definierten Menge an Preßsaft zu einer Standard-Elaterinidlösung verstreicht, bis eine Trübung eintritt. Die Trübung ist das Zeichen für den Beginn der Aglykon-Ausfällung.

Zur Objektivierung wurde die entstehende Trübung mit einem Photometer bei einer geeigneten Wellenlänge und mit synchron laufendem Schreiber aufgezeichnet (s. exp. Teil). Als Maß für die Enzymaktivität nahmen wir die Zeit t, in der die halbe maximale Trübung erreicht wurde. Die Abb.46 zeigt den typischen Verlauf einer solchen Messung.

Zahlenmäßig wird die Elaterase-Aktivität ausgedrückt als das Hundertfache des reziproken Wertes der Zeit t in Minuten.

Als Vorteil der geschilderten Methode erscheint mir, daß der tatsächliche Zeitaufwand begrenzt ist auf die Ernte des Pflanzenmaterials und die anschließende Herstellung des Preßsaftes (s. Exp. Teil), während der eigentliche Meßvorgang automatisch abläuft.

Die Reproduzierbarkeit reichte für die angestrebten Aussagen aus. Die durchschnittliche Abweichung der Einzelwerte von den Mittelwerten aus zwei Bestimmungen lag bei neun Prozent. Bei extrem flachem Kurvenverlauf war t allerdings schlecht

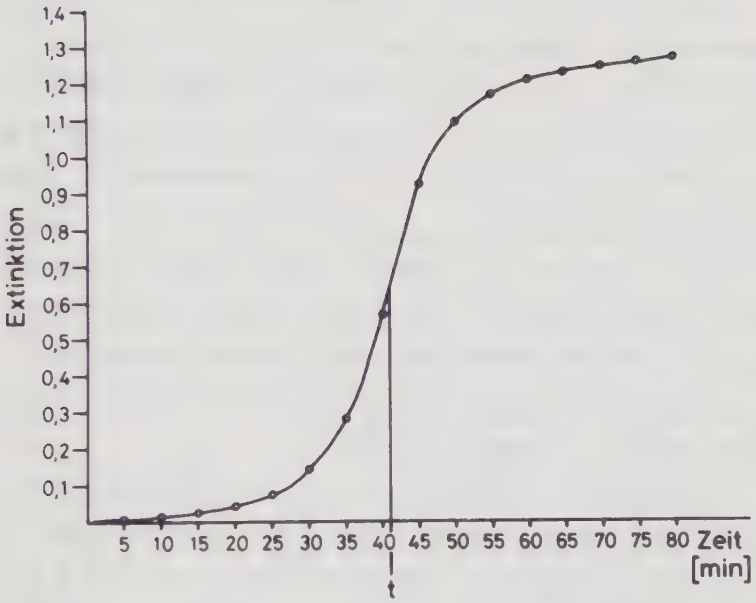


Abb. 46 : Typischer Verlauf der Messung der Elaterase-Aktivität eines G r a t i o l a - Preßsaftes

Abszisse gegenüber der Originalaufzeichnung gestaucht.

t = Zeit, in der die Hälfte des maximalen Substratumsatzes erfolgte.

zu bestimmen, weshalb auf die Angabe von Aktivitäten unter 0,5 min^{-1} verzichtet wurde (s. Tab. 12).

Analog durchgeführte Bestimmungen mit handelsüblichen ß-Glucosidasen (s. 9.3.4.) ergaben Aktivitäten von unter 0,5 min^{-1} bis 0,8 min^{-1}. Mit diesen Ansätzen durchgeführte Direkt-Messungen (s. 5.2.) erwiesen die Richtigkeit der Annahme einer Proportionalität zwischen Trübungsgrad und Menge des gebildeten Aglykons.

Um die Ergebnisse, die einmal durch quantitative Bestimmung der Einzelkomponenten, zum anderen durch Bestimmung der Enzymaktivität des Preßsaftes erhalten worden waren, vergleichen zu können, wurden die Werte in einem angeglichenen Maßstab graphisch dargestellt (Abb. 47).

Wie die graphische Darstellung (Abb. 47) erkennen läßt, besteht gute Übereinstimmung zwischen den mit den beiden Methoden erzielten Ergebnissen. Danach zeigt die in G r a t i o l a vorhandene ß-Glucosidase (Elaterase) Mitte Juli einen signifikanten Anstieg ihrer Aktivität auf das fünf- bis zehnfache des Wertes zur Zeit der Knospenbildung. Dieser Anstieg fällt in eine Zeit, in der sich die Pflanzen ausnahmslos in blühendem Zustand befinden (Hochblüte). Ziemlich bald nach dem Aufblühen müssen die Pflanzen befruchtet werden, denn bereits eine halbe Woche später kündigt sich die Entwicklung der Früchte durch Anschwellen der Fruchtknoten an. Mit zunehmender Reife der Kapseln sinkt die Elaterase-Aktivität wieder, um zur Fruchtreife Ende August kurzzeitig leicht anzusteigen.

Tab. 12 : Übersicht über den Entwicklungszustand der Pflanzen und die erhaltenen Werte bei der Bestimmung der Elaterase-Aktivität im Jahre 1977

Ernte-Datum	Entwicklungszustand Bez.+)	Größe [cm]	Gewicht [g]	Aktivität [min^{-1}] x_1	x_2	$\bar{x}$	$\frac{(\bar{x}-x_n)\ 100}{\bar{x}}$
06.07.	k2/3	24 26,5	5,4 5,2	0,71	0,69	0,7	± 1,43 %
08.07.	b1	25 28	2,7 6,3	1,23	1,12	1,18	± 4,68 %
11.07.	b2	30 30	4,9 8,9	3,14	2,45	2,8	± 12,34 %
12.07.	b3	24 30	3,0 2,2	1,89	2,17	2,03	± 6,9 %
15.07.	b4	24 30	3,8 3,8	1,1	1,47	1,28	± 14,1 %
23.08.	b5	37 33	4,1 2,9	<0,5	<0,5	<0,5	-
25.08.	b5/f1	33 35	3,7 3,5	<0,5	<0,5	<0,5	-
30.08.	f1	37 37	3,1 5,2	0,85	0,73	0,79	± 7,59 %
31.08.	f1/2	34 30	3,5 4,6	0,69	0,92	0,8	± 15,0 %
05.09.	f3	30 35	4,7 3,0	<0,5	<0,5	<0,5	-

Durchschnittliche Abweichung der Einzelwerte von den Mittelwerten: ± 8,86 %

+) s. 6.2., S. 114

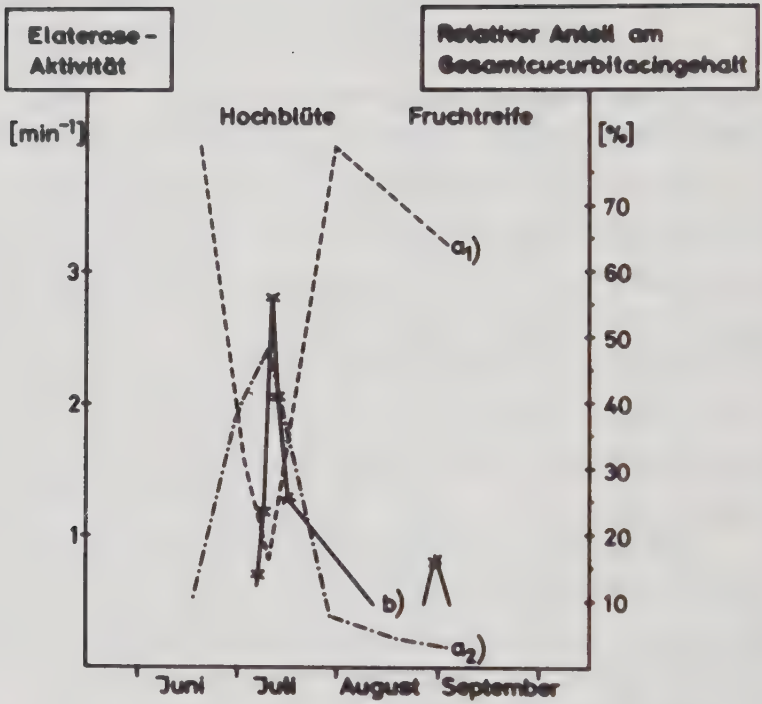


Abb.47 : Graphische Darstellung der Elaterase-Aktivität in Abhängigkeit vom Entwicklungszustand der generativen Organe

a) Ergebnisse der Messungen im Jahre 1976 durch Gehaltsbestimmung der Cucurbitacine E und I und ihrer Glucoside (Frischpflanzen)
   a_1) prozentualer Anteil von Elaterinid am Gesamtgehalt
   a_2) prozentualer Anteil von Cucurbitacin E am Gesamtgehalt
b) Ergebnisse der Messungen im Jahre 1977 durch Bestimmung der Elaterase-Aktivitäten von Frischpflanzen-Auszügen

Der steilere Anstieg der Aktivität im Juli 1977 gegenüber dem des Vorjahres hat seine Ursache darin, daß im Jahre 1977 durch einen kühlen, regnerischen Frühsommer die gesamte Entwicklung etwas verzögert wurde. Mit der Wetterbesserung und Erhöhung der Temperaturen Anfang Juli erfolgte dann die Entfaltung der Blütenknospen schlagartig, und eine Entwicklung, die unter anderen Bedingungen etwa drei Wochen dauert, erfolgte so in etwa einem Drittel der Zeit.

An dieser Stelle ist man geneigt, nach dem biologischen "Sinn" dieser Korrelationen zwischen Enzymaktivität und Entwicklungszustand, bzw. überhaupt nach der Funktion der Cucurbitacine, in der Pflanze und für die Pflanze, zu fragen. Zugegeben, es ist eine sehr menschliche Betrachtungsweise, die dieser Fragestellung zugrunde liegt. Zunehmend setzt sich aber heute die Erkenntnis durch, daß "sekundäre" Pflanzeninhaltsstoffe doch nicht nur "Abfall-" und Endprodukte des pflanzlichen Stoffwechsels darstellen, sondern physiologische und ökologische Aufgaben wahrnehmen.

In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, daß meiner Meinung nach die Erhöhung der Aktivität nicht einfach durch eine biochemische Substratinduktion zu erklären ist, da der Cucurbitacinglucosidgehalt zu dem in Frage kommenden Zeitpunkt keine wesentliche Erhöhung erfährt (vgl. 6.2.). Vielmehr nehme ich an, daß hier eine genetische Steuerung vorliegt, eine Hypothese, die auch schon von REHM (1960) diskutiert wurde, nachdem er ähnliche Verhältnisse bei einigen Cucurbitaceen beobachtet hatte.

Ohne mich nun allzu sehr im rein Spekulativen verlieren zu wollen, scheint es mir doch angebracht, eine mögliche Rolle der Cucurbitacine als wachstumsregelnde Pflanzenstoffe in Erwägung zu ziehen. Einige Befunde, die dafür sprechen, möchte ich kurz erwähnen.

Nach GUHA und SEN (1973) sollen die Cucurbitacine B, E, I, J und K gibberellin-antagonistische Wirkungen zeigen. Die Gibberelline selbst, oft auch als "Blühhormone" bezeichnet, induzieren unter anderem auch eine erhöhte Aktivität bestimmter Enzyme (KOBLITZ 1969). Ähnlichkeiten im Biosynthese-Weg lassen gegenseitige Umwandlungen von Triterpenoiden und Gibberellinen möglich erscheinen (PALEG 1965). Auf den Einfluß der Cucurbitacine auf die Mitose (POHLMANN 1974) und wahrscheinlich auch den Ionentransport (vgl. Abschn. 7) sei hier ebenfalls hingewiesen. Schließlich kann man noch, um auf die erhöhte Glucosidase-Aktivität zurückzukommen, hier vielleicht auf eine Umwandlung von Transport- in Depot- und/oder Wirkformen schließen (vgl. dazu auch HEMPHILL u. Mitarb. 1973).

Möglicherweise läßt aber auch die Tatsache, daß die Enzyme in der intakten Pflanze nicht auf die Cucurbitacinglucoside einwirken können (vgl. 6.2.), den Schluß zu, daß die Wirkung der Elaterase, über deren Spezifität noch keine endgültigen Untersuchungen vorliegen, primär gar nicht auf die Cucurbitacine gerichtet ist.

Ein anderer Aspekt verdient ebenfalls noch eine kurze Erwähnung. So zeigten Untersuchungen von CHAMBLISS und JONES (1966) sowie von NIELSEN u. Mitarb. (1977), daß bei Cucurbitaceen und I b e r i s - Arten die Cucurbitacine für bestimmte Insekten-Arten spezifische Lockstoffe darstellen, während sie gegenüber anderen als Fraßschutz dienen. NIELSEN u. Mitarb. (1977) erscheint letzteres sogar als d i e Funktion der Cucurbitacine überhaupt.

Wenn auch Vieles an den angedeuteten Zusammenhängen noch Spekulation ist, so bin ich doch überzeugt, daß man die Ergebnisse dieses Abschnittes nicht isoliert sehen darf, sondern sie in einen größeren Rahmen stellen muß, den aufzuzeigen ich versucht habe.

6.4. Die Triterpenoide in aus Gewebekulturen regenerierten G r a t i o l a - Sprossen

Um einen Einblick in die primär in G r a t i o l a gebildeten Triterpenoide zu bekommen untersuchten wir, mangels Keimpflanzen (vgl. Seite 17), junge Sprosse, die aus Kalli in Gewebekulturen regeneriert worden waren (ohne Wurzeln).

Die Kalli stammten von Blättern und Stengeln der in Marburg angebauten Pflanzen (Juli 1977). Nach erfolgter Induktion der Primärkalli mit den üblichen Methoden wurden in der Organkultur auf Agar-Böden (Nährmedium S XXI nach FRANK+); 25 °C, dunkel) jeweils immer nur Sprosse gebildet, aber keine Wurzeln.

+) Weitere Einzelheiten in der Dissertation von Bruno FRANK (Marburg, in Vorbereitung), dem ich auch an dieser Stelle für die Überlassung von Material und Informationen herzlich danke.

Die beiden untersuchten Proben ("III/1,6" und "IV/0,8") waren insgesamt sieben Monate in Kultur (3 Passagen), zuletzt auf Agar-Böden, die 1,07 ppm NES (= Naphthylessigsäure) und 0,53 ppm BA (= Benzyladenin) ("III/1,6"), bzw. 0,6 ppm NES und 0,2 ppm BA ("IV/0,8") enthielten.

Jeweils eine Hälfte des Materials wurde in Wasser der Autolyse überlassen, die andere Hälfte mit der zehnfachen Menge Äthanol (70 %) unter Verwendung eines Ultra-Turrax extrahiert. - Bei der Chromatographie zeigte sich kein Unterschied, d.h. beide Proben zeigten keine enzymatischen Veränderungen.

Nur in der Probe "III/1,6" konnten Spuren an Elaterinid (etwa 0,005 % des Frischgewichtes) nachgewiesen werden, die nach halbjähriger Aufbewahrung des eingedampften Extraktes zu 90 % in Cucurbitacin L-Glucosid umgewandelt waren (dc-Nachweis).

Nach Besprühen mit Vanillin-Schwefelsäure waren in beiden Extrakten zwei Hauptflecken nachweisbar, die in den Systemen IIa und III zwar praktisch gleiche Laufstrecken wie Cucurbitacin E und Elaterinid aufwiesen, jedoch zu keiner Fluoreszenzlöschung führten und mit dem oben genannten Reagenz eine andere Färbung (violett → grau) ergaben. Bei der Probe "IV/0,8" war zusätzlich ein weiterer starker Fleck mit gleichem Anfärbeverhalten bei R_f = 0,5 (System III) anzutreffen. - Bei der DC in System X zeigte die unpolare Substanz gleiche Laufstrecken und gleiche Anfärbung wie mitchromatographierte Sterole (Sitosterol, Cholesterol). Eine daraufhin vorgenommene gc-Analyse (siehe 9.3.3.5.) ergab als Hauptkomponenten bei beiden Proben Sitosterol, Stigmasterol und Campesterol, allerdings in unterschiedlichen Konzentrationen, über die Tabelle 13 Auskunft gibt.

Tab. 13 : Gc bestimmter Sterolgehalt (Cholesterol als innerer Standard) von Sproß-Regeneraten

Sterol	R_t [min] SE 30, 250 °C	Gehalt in Prozent des Frischgewichtes "III/1,6" 1,07 ppm NES 0,53 ppm BA	"IV/0,8" 0,6 ppm NES 0,2 ppm BA
Campesterol	27	0,0004	0,0005
Stigmasterol	29	0,001	0,003
Sitosterol	33,4	0,003	0,01

6.5. Diskussion der in Abschnitt 6 erhaltenen Ergebnisse

Die Abbildungen 42 (Seite 116) und 43 (Seite 117) zeigen die (üblichen) Schwierigkeiten auf, die sich bei der Interpretation biologischer Untersuchungsergebnisse vor allem hinsichtlich der Bezugsgrößen ergeben (vgl. dazu HEGNAUER 1953).

Vergleicht man den Gesamtgehalt in den getrockneten und in den frischen Pflanzen, so stellt man fest, daß, berechnet man den Gehalt als mg Cucurbitacine pro Pflanze (und nicht pro Frisch-, bzw. Trockengewicht), in beiden Fällen ein Anstieg vom Beginn der Vegetationsperiode an zu verzeichnen ist, der der Zunahme der Pflanzenmasse parallel läuft. Der maximale Gehalt wird in beiden Fällen zu Beginn der Hochblüte erreicht.

Im Falle der Frischpflanzen bleibt der Cucurbitacin-Gehalt auch weiterhin in enger Relation zu der Pflanzenmasse, so daß sich der prozentuale Cucurbitacin-Gehalt während des ganzen

Sommers nur geringfügig ändert - wohingegen er bei getrockneten Pflanzen (geerntet nach der Hochblüte) stetig sinkt. Dies kann seine Ursache darin haben, daß während des Trocknungsprozesses aus den vier von uns bestimmten Cucurbitacinen andere entstehen, die ihrerseits aber mit der angewandten Bestimmungsmethode nicht erfaßt werden.

Darüberhinaus ist auch denkbar, daß ein Zusammenhang besteht zwischen dem Wassergehalt der Pflanzen und dem Cucurbitacingehalt; denn die erwähnten Schwankungen der Frischpflanzenmasse sind vorwiegend auf unterschiedlichen Feuchtigkeitsgehalt, nicht aber auf derart große Schwankungen der Trockenmasse (s. Abb. 43, S. 117) zurückzuführen. - Auf jeden Fall sollten die Pflanzen zur Gewinnung einer cucurbitacinreichen Droge zu Beginn oder während der Hochblüte, also etwa gegen Ende Juni, geerntet werden (reife Früchte sollten also in der Droge nicht zugelassen sein).

Auf die Schwankungen der Elaterase-Aktivität und ihre Korrelation zu bestimmten Entwicklungsstadien bin ich bereits in Abschnitt 6.3. ausführlich eingegangen. Offenbar gelten diese Beobachtungen nicht nur für die Aktivität der Elaterase sondern auch für eine Acetyl-Esterase, wie aus der Abbildung 45 (Seite 119) ersichtlich ist.

Die bei den gerade ausgetriebenen Sprossen (1. Ernte) beobachtete hohe Elaterase-Aktivität (s. Abb. 44, S. 118) fehlt offenbar den jungen Pflanzen, zumindest den aus Kallusgewebe regenerierten Sprossen. Darauf mag auch zurückzuführen sein, daß SCHRALL (1977) in Gewebekulturen von B r y o n i a keine neugebildeten Cucurbitacine nachweisen konnte (Prüfung nur auf Aglyka, nach Autolyse).

Sowohl die Untersuchungen im Verlauf der Vegetationsperiode als auch das Ergebnis der Prüfung von "III/1,6" im Falle der Sproß-Regenerate lassen vermuten, daß die Bildung der Cucurbitacine zunächst auf der glykosidischen Stufe erfolgt und daß Elaterinid als die primär entstehende Verbindung der Cucurbitacin-Biosynthese aufzufassen ist, aus der durch Desacetylierung, Reduktion und Glykosidhydrolyse die anderen, bisher in G r a t i o l a nachgewiesenen Cucurbitacine entstehen. - Interessant erscheint mir auch der Befund, daß in der Gewebekultur-Probe, in der Elaterinid nachzuweisen war, der Gehalt an Phytosterolen signifikant niedriger ist als in der cucurbitacinfreien Probe. Direkte Umwandlungsmöglichkeiten scheinen hier nicht ausgeschlossen. Dabei scheint der Weg von gemeinsamen biosynthetischen Vorstufen zu den Cucurbitacinen (im engeren Sinne) bevorzugt vor dem Weg zu den Gratiogenin-Derivaten (die erst später auftreten; s. S. 115) beschritten zu werden, wofür vielleicht die von MOSS (1966) zusammengestellte hypothetische Biosynthese-Reihe eine Erklärung liefern kann.

Ich hoffe damit einige Aspekte beleuchtet zu haben, die es wert sind, weiteruntersucht zu werden. Mit dem folgenden Kapitel möchte ich versuchen, nun, nachdem Toxikologen, Chemiker, Krebsforscher und Biologen die Cucurbitacine bereits als Arbeitsgebiet für sich entdeckt haben, auch den Pharmakologen einen Anreiz zu geben, sich mit dieser interessanten Naturstoffgruppe etwas intensiver zu beschäftigen.

7. Pharmakologische Untersuchungen zur Frage der Herzwirksamkeit von G r a t i o l a

7.1. Problemstellung

Ich habe bereits in der Einleitung zu dieser Arbeit über die widersprüchlichen Befunde hinsichtlich einer Herzwirksamkeit von G r a t i o l a berichtet, die uns veranlaßten, dieser Frage nachzugehen. Bei allen früheren Untersuchungen wurde auf eine cardio - t o x i s c h e Wirkung am ganzen Tier geprüft. Es wurden keine Versuchsanordnungen angewandt, die eine Aussage über eine spezifische Wirkung auf das Herz gestattet hätten. Im Gegensatz zu den mannigfaltigen Symptomen, die eine Herzglykosidintoxikation im Gesamtorganismus hervorruft, ist die spezifische Wirkung der Herzglykoside auf isolierte Organ-Präparate (hier besonders das isolierte Herz) sowohl im therapeutischen als auch im toxischen Bereich klar definiert und überschaubar. Die Effekte können mit geeigneten Instrumenten objektiv gemessen und registriert werden. Unsicherheiten, die in der Heterogenität des Tiermaterials sowie in unterschiedlicher Resorption, Verteilung und Metabolisierung begründet liegen, scheiden mit der Testung von Substanzen am isolierten Erfolgsorgan aus. Im Falle der Herzglykoside ergibt sich so für alle Vertreter das qualitativ gleiche Wirkungsbild, in dessen Vordergrund die positiv inotrope Wirkung im therapeutischen und, letztlich, der systolische Herzstillstand im toxischen Bereich stehen.

Zur Prüfung auf eine inotrope Wirkung ist nach REITER (1967) die Testung am isolierten Papillarmuskel die Methode der Wahl.

Da aber im vorliegenden Fall nicht nur Veränderungen der Kontraktionskraft, sondern auch Veränderungen der Herzfrequenz und des Koronardurchflusses Berücksichtigung finden sollten, gaben wir der Perfusion des ganzen isolierten, spontan schlagenden Warmblüterherzens (Methode nach LANGENDORFF, in der Modifikation nach FOZARD und MUSCHOLL, 1971; s. Exp. Teil) den Vorzug.

Neben der Möglichkeit, außer der Kontraktionskraft auch noch andere Parameter für eine Herzwirksamkeit messen zu können, bietet die Methode den weiteren Vorteil, daß die Konzentration der zu testenden Substanz im Perfusionsmedium über die Dauer des Versuches konstant gehalten werden kann, unabhängig davon, ob Durchflußveränderungen auftreten oder nicht. Hingegen wirkt sich nachteilig aus, daß, abhängig von der Perfusionsdauer, relativ große Mengen der Testsubstanz erforderlich sind, ein Umstand, der bei der Prüfung von Naturstoffen schnell zum begrenzenden Faktor wird.

Unser Problem bestand also darin, einen Kompromiß zwischen der zu erreichenden Reinheit (und damit meistens der Menge) einer isolierten Substanz einerseits und der statistisch gesicherten Aussagekraft unserer Versuche andererseits, zu schließen, was nicht in allen Fällen befriedigend gelang. Meistens wurden Extrakte oder Fraktionen getestet, die eine Substanz in konzentrierter, aber noch nicht ganz reiner Form enthielten.

Trotz dieser Einschränkungen sind wir der Meinung, daß die im Verlauf dieses Abschnittes dargestellten Versuchsergebnisse und die daraus gezogenen Folgerungen Gültigkeit besitzen und

reproduzierbar sind, zumindest in qualitativer Hinsicht, wenn auch im Einzelfall die ungenügende Anzahl der Versuche und die Komplexheit der getesteten Extrakte problematisch erscheinen mögen.

Von den als Lieferanten für die isolierten Herzen zur Wahl stehenden Tiergattungen entschieden wir uns für Meerschweinchen (s. Exp. Teil). Im Vergleich mit Kaninchen reagieren sie auf die verschiedensten Pharmaka empfindlicher, was im Hinblick auf die Begrenztheit der zur Verfügung stehenden Substanzmengen vorteilhaft erschien. Nicht zuletzt erfolgte die Wahl auch aus finanziellen Erwägungen.

Ziel der nachfolgend beschriebenen Untersuchungen sollte also in erster Linie sein, Aufschluß über die folgenden Fragen zu erhalten:

1. Zeigen G r a t i o l a - Extrakte überhaupt eine Wirkung auf das i s o l i e r t e Herz?
2. Wenn ja, ist die Wirkung mit der von Cardenoliden vergleichbar?

Für den Fall, daß tierexperimentell keine Cardenolide nachgewiesen werden konnten, sollte versucht werden, die verschiedenen, eingangs erwähnten Indikationen für das Gottesgnadenkraut mit dem Vorkommen anderer Inhaltsstoffe zu erklären, wobei besonders an die Cucurbitacine zu denken war.

Bezüglich der Cucurbitacine bestand vor Beginn dieser Arbeit noch ein weiteres Problem, welches wir ebenfalls im Verlauf der Untersuchungen am isolierten Herzen zu klären hofften. Es betraf die Berichte von STIEGELE (1954) über die Wirkung

homöopathischer Zubereitungen von I b e r i s a m a r a auf die subjektiven Beschwerden von Herzkranken. Auf Grund seiner Erfahrungen mit solchen Zubereitungen stellte STIEGELE (1954) I b e r i s in eine Reihe mit D i g i t a l i s und A c o n i t u m.

I b e r i s enthält aber, wie schon erwähnt, ebenso wie G r a t i o l a Cucurbitacine. Diese Tatsachen veranlaßten bereits GMELIN (1967), anzuregen, die Wirkung von Cucurbitacinen auf das Herz zu überprüfen. Es erschien durchaus denkbar, daß die Cucurbitacine eine Cardenolid-Wirkung zeigten oder vortäuschten. Diese Anregung griffen wir umso lieber auf, als sich hier eine Gelegenheit bot, vielleicht die Zusammenhänge zwischen Struktur und Wirkung der Herzglykoside etwas besser kennenzulernen.

In der einschlägigen Literatur wird häufig vorgegeben, die Struktur-Wirkungsbeziehungen der Herzglykoside seien bekannt, und man nennt Strukturmerkmale, die angeblich für eine Herzwirksamkeit essentiell sind. Tatsächlich aber ist das einzige Strukturmerkmal, das bisher in allen wirksamen teilsynthetischen und natürlichen Verbindungen enthalten war, die ungesättigte Seitenkette (BAUMGARTNER, LINDE u. Mitarb. 1974). Diese und noch einige andere, auch den Cardenoliden eigene, Merkmale haben aber auch die Cucurbitacine (s. Abb. 2, S. 11). Es erschien also durchaus möglich, daß diese Verbindungsklasse auch digitaloide Wirkungen entfaltet.

Über die pharmakologischen Eigenschaften der Cucurbitacine liegt meines Wissens erst eine einzige detaillierte Arbeit vor, die sich mit den pharmakodynamischen Wirkungen des

Cucurbitacins D beschäftigt (EDERY u. Mitarb. 1961). Diesen Untersuchungen zufolge führt Cucurbitacin D in Dosen über 0,5 mg/kg Körpergewicht beim Hund zu negativ inotropen und negativ chronotropen Wirkungen sowie zu einer starken Blutdrucksenkung. An isolierten Herzen von Katzen und Kaninchen bewirkte die Substanz ebenfalls eine Verminderung von Kontraktionskraft und Frequenz bei gleichzeitig stark gesteigertem Koronardurchfluß.

Diese Befunde schienen also mit unseren bis dato angestellten Überlegungen unvereinbar zu sein. Es blieb aber noch zu prüfen, ob Cucurbitacine vom α-Hydroxy-keton-Typ (z.B. Cucurbitacin D) und die in G r a t i o l a und I b e r i s vorkommenden Diosphenole die gleichen Effekte zeigten.

Auf weitere Einzelheiten der pharmakodynamischen Analyse durch EDERY u. Mitarb. (1961) möchte ich bei der Diskussion der Ergebnisse dieses Abschnittes noch einmal zurückkommen.

7.2. Ergebnisse der Prüfungen am isolierten Meerschweinchen-Herz

Parallel zu der Suche nach Cardenoliden in den Fraktionen, die bei einem ersten säulenchromatographischen Anreicherungsversuch (SC 1, s. 4.2.) erhalten worden waren, versuchte ich, für einige dieser Fraktionen am LANGENDORFF - Herzen eine Herzwirksamkeit nachzuweisen [+]. Dazu wählte ich die Fraktionen FC,

---

+) Herrn Prof. Dr. Dr. J. Krieglstein und seinen Mitarbeitern vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie im Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg danke ich auch an dieser Stelle für die Einweisung in die Präparationstechnik.

FD und FE aus, deren Prüfung besonders aussichtsreich erschien, da in ihnen, nach der DC-Kontrolle, eine KEDDE - positive Substanz (= potentielles Cardenolid) offenbar in größeren Mengen enthalten war.

Wir versuchten, die Konzentration an dieser Substanz im Perfusionsmedium etwa in dem Bereich zu halten, der in der Literatur für eine therapeutische Wirksamkeit von Herzglykosiden bei der Prüfung am LANGENDORFF - Präparat angegeben ist. Die Tab. 14 (S. 142) unterrichtet über die verwendeten Konzentrationen und die erzielten Effekte auf Kontraktionskraft und Schlagfrequenz. Zum Vergleich sind an erster Stelle die unter gleichen Perfusionsbedingungen beobachteten Wirkungen von Digitoxin aufgeführt.

Zu beachten ist dabei, daß die Ausbildung des positiv - inotropen Effektes im Fall des Digitoxins einen Zeitraum von etwa zwanzig Minuten beansprucht. Charakteristisch bei dieser Prüfung ist außerdem das Absinken der Frequenz um etwa 25 Prozent des Ausgangswertes und, bei beginnender Intoxikation im Verlauf der Perfusion, das Auftreten von Arrhytmien. Therapeutischer und toxischer Effekt liegen also sehr nahe beisammen und können praktisch durch die gleiche Konzentration an Digitoxin im Perfusionsmedium erzeugt werden.

Diese Tatsache führte bei den nachfolgenden Untersuchungen der G r a t i o l a - Fraktionsrückstände zu Schwierigkeiten bei der Interpretation der Ergebnisse, da nie ganz auszuschließen war, daß die verwendeten Konzentrationen bereits toxische Effekte bewirkten. Für die Annahme einer schweren Intoxikation sprach auch die Beobachtung, daß die relativ starken negativen

Tab. 14 Effekte verschiedener Fraktionen (SC 1) mit potentiellen Cardenoliden auf Frequenz und Kontraktionskraft des isolierten Meerschweinchenherzens

Substanz	Konzentration[1] [g/ml]	Alkoholkonz.[1] [°/oo]	Gesamtdauer[2] [min]	Effekte Änderungen in % der Kontr.[3] b/min[4]	KK[4]	$KK_{max.}$	Effekt reversibel	Sonstiges
Digitoxin (Vergl.)	$3x10^{-7}$	0,02	20	- 25	+ 19	bis + 56	ja	nach 20 min Arrhythmien
F C	$3x10^{-5}$	3	27	- 21	- 10	bis - 32	nein	-
	$3x10^{-5}$	3	10	- 14	± 0	bis - 22	nein	nach 10 min AV-Block
	$3x10^{-5}$	3	7	-	± 0	bis -100	-	Herzstillstand
F D	$3x10^{-5}$	0,3	23	- 15	+ 25	bis - 25	ja	-
	$6x10^{-5}$	0,6	9	- 22	+ 28	± 0	nein	nach 5 min Arrhythmien
	$6x10^{-5}$	0,6	16	- 17	+ 15	+ 15	nein	-
	$6x10^{-5}$	0,6	13	- 18	+ 27	bis - 10	nein	-
	$6x10^{-5}$	0,6	16	- 15	+ 11	bis - 5	-	ohne Ausspülen Zusatz von F E
F E	10^{-4}	0,6	34	± 0	- 6	bis - 35	-	-

1) im Perfusionsmedium 2) Dauer der Perfusion mit Test-Substanz 4) nach 1 min
3) als Kontrolle wird hier der Wert bezeichnet, der unmittelbar vor dem Umschalten

Wirkungen der G r a t i o l a - Fraktionsrückstände im allgemeinen durch Spülen mit Tyrodelösung nicht auswaschbar waren, während dies im Falle des Digitoxins noch gelang.

Übereinstimmung mit einer Herzglykosidwirkung konnte sich unserer Meinung nach ergeben durch die Abnahme der Frequenz um etwa den gleichen Betrag wie durch Digitoxin, sowie durch die anfängliche Erhöhung der Kontraktionskraft um etwa zwanzig Prozent, die allerdings sehr schnell (innerhalb drei Minuten) wieder abklang und zu einer fortschreitenden Abnahme der Kontraktionskraft bis hin zum Herzstillstand bei leicht gestiegener diastolischer Spannung führte. Es war zu diesem Zeitpunkt also noch durchaus denkbar, daß wir es hier mit herzwirksamen Glykosiden zu tun hatten, die aber ihre Wirkung im Gegensatz zum Digitoxin sehr schnell entfalteten und bei weiterer Perfusion zu toxischen Effekten führten.

Dem Einwand, die Steigerung der Anfangsinotropie beruhe auf einer Artefakt - Bildung durch das Umschalten, glaubten wir durch die im Exp. Teil(siehe 9.8.)beschriebenen Maßnahmen zur Verhinderung von Artefakten begegnen zu können.

Eine weitere Ursache für aufgetretene Ungereimtheiten konnte unseres Erachtens aber auch noch in dem doch zum Teil recht hohen Alkoholgehalt des Perfusionsmediums liegen, der notwendig war, um die Fraktionsrückstände in Lösung zu halten.

Eine Möglichkeit war natürlich auch noch, daß die in den Fraktionen mit ziemlicher Sicherheit vorhandenen, aber bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht als solche identifizierten Cucurbitacine für die beobachteten Effekte verantwortlich waren, zumal ja auch Übereinstimmung mit den Befunden von

EDERY u. Mitarb. (1961) hinsichtlich der negativ inotropen und negativ chronotropen Wirkungen zu verzeichnen war.

Nach diesen, in der Tab. 14 (S. 142) zusammengefaßten, vorläufigen Untersuchungen war es also vordringlich, sowohl größere Konzentrationsbereiche mit den Perfusionen abzudecken, als auch andere Substanzklassen wie Flavonoide, Cucurbitacine und auch den Alkohol im Perfusionsmedium als Verursacher der beobachteten Effekte in Erwägung zu ziehen.

Das wichtigste Ergebnis, das sich aus diesen Überlegungen ergab, war die mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit gelungene Identifizierung des KRUG'schen "Gratiotoxins" als Elaterinid, dem Glucosid des Cucurbitacins E (siehe 4.3.4.; Formel siehe Seite 11), womit sich für die weiteren pharmakologischen Prüfungen eine völlig andere Situation ergab.

Die Wahrscheinlichkeit, daß in G r a t i o l a Herzglykoside vorkommen, war damit noch geringer geworden. Es mußte daher unsere Aufgabe sein, eine andere Erklärung für die Herzwirksamkeit des Gottesgnadenkrautes zu finden und dafür vor allem Cucurbitacine in Betracht zu ziehen.

Die weiteren Untersuchungen dienten vorwiegend dem Ziel, geeignete Konzentrationsbereiche zu finden und die Cucurbitacin - Wirkung von der anderer herzwirksamer Substanzen zu differenzieren. Das Ergebnis dieser Prüfungen ist in den Abbildungen 48, 49 und 50 auf den folgenden Seiten dargestellt. Sie zeigen, daß die Anwesenheit von Äthanol im Perfusionsmedium zu einer leichten Steigerung der Kontraktionskraft führt, während die Herzfrequenz unbeeinflußt bleibt. Gleiches gilt auch für den Koronardurchfluß. Die allmähliche Abnahme mit fort-

Fortsetzung Seite 147

Abb. 48

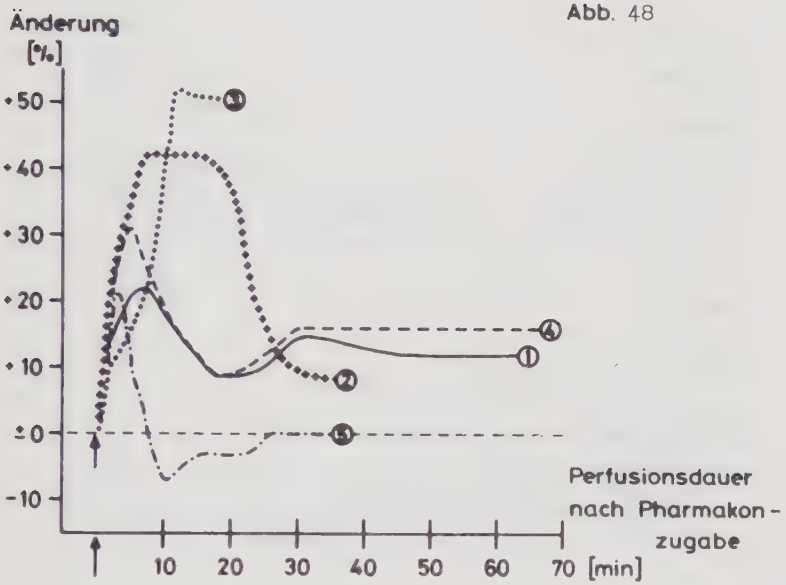


Abb. 48 : Zeitliche Entwicklung der Kontraktilität des isolierten Meerschweinchenherzens nach Gabe verschiedener inotrop-wirksamer Pharmaka

1 Äthanol 96 %, Konzentration 0,5 °/oo
2 Crataegus-Perkolat, " 0,5 °/oo
3 Digitoxin, 3×10^{-7} g/ml Tyrode-Lsg., Äthanol-Gehalt 0,2 °/oo
4 Elaterinid, 10^{-7} " " " 0,01 °/oo
5 E II, Gratiola, 10^{-5} " " " 0,08 °/oo

↑ Umschalten auf Pharmakon-haltige Lösung

Änderung der Kontraktionskraft in Prozent des Ausgangswertes
Experimentelle Einzelheiten siehe 9.8.

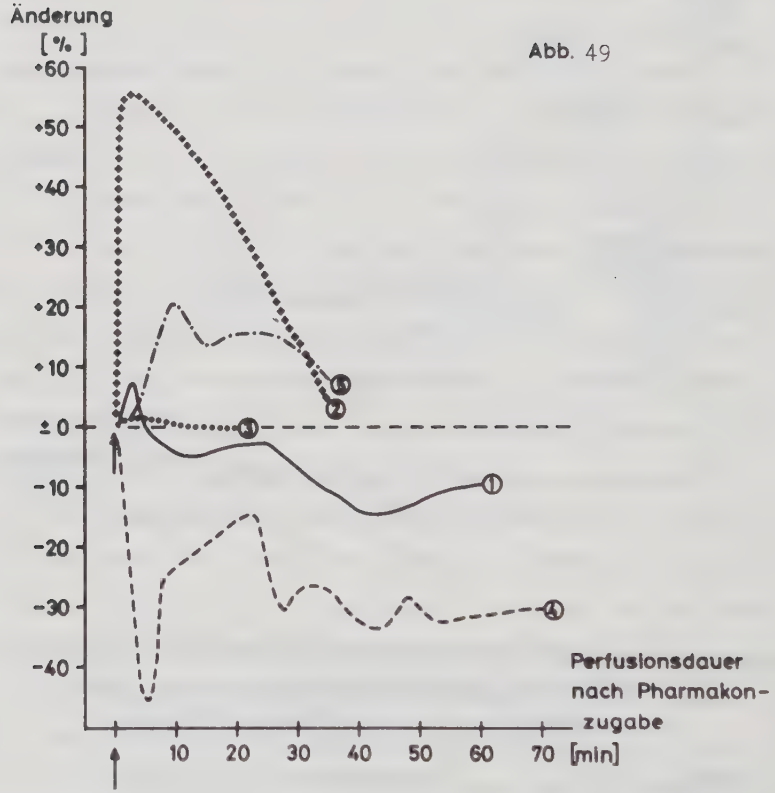


Abb.49 : Veränderungen des Koronardurchflusses im Verlauf der Perfusion

Erläuterungen s. Abb. 48

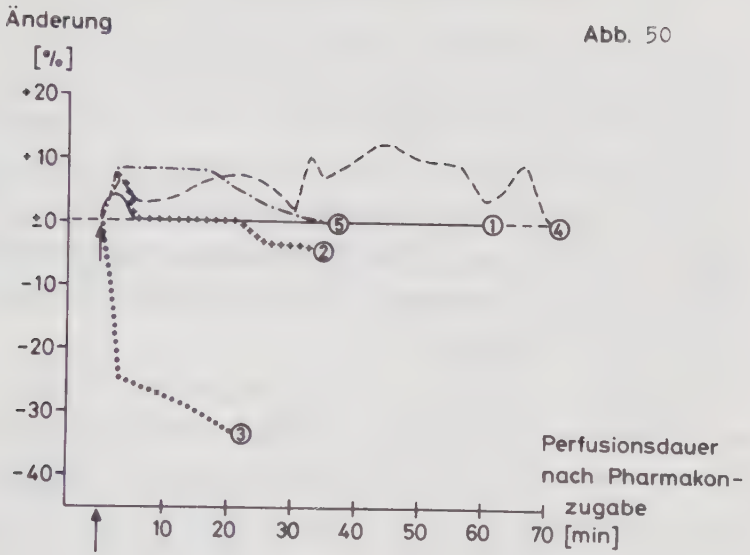


Abb.50 : Veränderungen der Herzfrequenz im Verlauf der Perfusion

Erläuterungen s. Abb. 48

schreitender Dauer der Perfusion erfolgt auch bei nur mit Tyrodelösung perfundierten Herzen. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Befunden von GAILIS und VERDY (1971).

Die Prüfung eines aus Koloquinthen gewonnenen Elaterinid-Präparates in einer Konzentration von 10^{-7} g/ml zeigte im wesentlichen das gleiche Bild, was zu dem Schluß führt, daß Elaterinid in dieser Konzentration noch keine Wirkung auf das Herz entfaltet.

Die initialen Steigerungen der Kontraktionskraft bei Elaterinid und dem Chloroform-Isopropanol-Extrakt (E II) aus G r a t i o l a, in dem Desacetyl- Elaterinid und Gratiosid mengenmäßig dominieren, sind wohl auf den Äthanolgehalt der Perfusionslösungen zurückzuführen. Es besteht ein signifikanter Unterschied zu den positiv inotropen Wirkungen, wie sie durch Digitoxin und das Weißdorn-Perkolat hervorgerufen werden (Abb. 48). Damit verlieren für eine Interpretation die in Tab. 14 (S.142) dargestellten kurzfristigen Kontraktionssteigerungen an Bedeutung.

Im Gegensatz zu Elaterinid zeigt der Gratiola-Extrakt E II mit Ausnahme der Anfangsphase gegenüber der Kontrolle mit Äthanol eine deutlich gesenkte Kontraktionskraft und einen erhöhten koronaren Durchfluß, während die Frequenz nicht wesentlich beeinflußt wird. Der Chloroform-Isopropanol-Extrakt aus G r a t i o l a (E II) enthält etwa fünf Prozent Desacetyl-Elaterinid, was einer Konzentration von $5x10^{-7}$ Gramm Cucurbitacin-Glykosid pro Milliliter Perfusionsmedium entspricht. Er wäre damit fünfmal höher dosiert gewesen als Elaterinid, was die ausgeprägtere Wirkung erklären würde.

Um die Wirkungen von G r a t i o l a - Extrakten besser mit der von Elaterinid vergleichen zu können, wurde in den folgenden Versuchen der Chloroform-Extraktrückstand E I_H verwendet, der zum größten Teil aus Elaterinid und geringen Mengen an Cucurbitacinaglyka bestand. Es wurden bei diesen Prüfungen bewußt weitgehend ungereinigte Präparate verwendet, um auch die eventuell vorhandene Wirkung von Begleitstoffen einzubeziehen. Aus dem gleichen Grund wurde das Vergleichs-

Elaterinid-Präparat aus Koloquinthen und nicht aus dem Gnadenkraut hergestellt. Da es unwahrscheinlich war, daß in beiden Präparaten die gleichen Begleitstoffe vorhanden waren, sollte der direkte Vergleich eines Extraktes aus G r a t i o l a mit einem Extrakt aus C o l o c y n t h i s beweisen, daß die Wirksamkeit der Extrakte auf das isolierte Herz nur auf ihren Gehalt an Cucurbitacinen zurückzuführen war.

Die Wiedergabe einer Original-Aufzeichnung in Abb.51 zeigt die Effekte, die durch Perfusion mit E I_H hervorgerufen wurden.

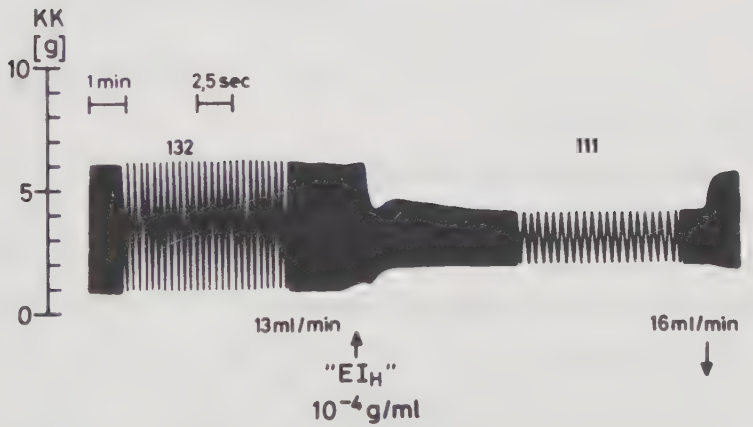


Abb.51 : Charakteristische Beeinflussung der Herzfunktionen durch den Gratiola-Extrakt "E I_H"
(nach Original-Aufzeichnungen Versuch 5/77)

Die Zahlen oberhalb des Kraftbandes geben die Frequenz in Schlägen pro Minute an, die Zahlen unterhalb die Durchflußmenge.

Charakteristisch ist die Verminderung von Schlagfrequenz und Kontraktionsamplitude sowie der gestiegene Koronardurchfluß. Beim Vergleich mit den in Tab. 14 (S.142) beschriebenen Wirkungen erkennt man weitgehende Übereinstimmung. Das bedeutet, daß sowohl die Fraktionsrückstände des Chloroform-Isopropanol-Extraktes als auch der Chloroform-Isopropanol-Extrakt selbst ebenso wie der Chloroform-Extrakt aus G r a t i o l a am isolierten Herzen die gleichen Veränderungen der Herzfunktion, nämlich negative Chrono- und Inotropie sowie eine Steigerung des koronaren Durchflusses, bewirken. Dieses charakteristische Wirkungsbild ist kennzeichnend für die Cucurbitacine.

Eine Bestätigung für diese Behauptung liefert der Vergleich der Dosis-Wirkungskurven von Elaterinid (Colocynthis) und E I_H (Gratiola) (s. Abb. 52 , S.154), die einen übereinstimmenden Verlauf zeigen.

Daß die Abbildung sich auf die Darstellung der inotropen Wirksamkeit beschränkt, hat experimentelle Gründe. Während nämlich der negativ-inotrope Effekt innerhalb großer Konzentrationsbereiche weitgehend auswaschbar ist, trifft dies in gleichem Ausmaß auf die anderen Wirkungen nicht zu. Außerdem sind Veränderungen der Frequenz und des Durchflusses in hohem Maß abhängig von den Ausgangswerten. Wie bereits erwähnt, kommt es im Verlauf einer Perfusion zu einer allmählichen Verringerung der Herzfunktionen. Während jedoch die Kontraktionsamplitude durch Nachstellen an den Ableitungsfäden im Verlauf des Versuchs korrigiert werden kann, ist dies bei Frequenz und Durchfluß nicht möglich. Um daher verschiedene Konzentrationen an einem Präparat testen zu können, mußten wir

uns auf die Darstellung der inotropen Wirkungen in Abhängigkeit von der applizierten Dosis beschränken.

Die Tabelle 15 auf der folgenden Seite gibt Aufschluß über die Reihenfolge der Perfusionen, die eingesetzten Konzentrationen und die erzielten Effekte.

Erwartungsgemäß sind die Standardabweichungen recht hoch, selbst bei den Werten der Kontrollgruppe. Eine Erhöhung der Reproduzierbarkeit etwa um den Faktor 5 läßt sich allerdings durch nur einmalige Applikation pro Herz erreichen (vgl. dazu die jeweils ersten Werte der Kontrollgruppe). Aus den eingangs dargestellten Gründen war dies aber leider nicht für alle Versuche durchführbar.

Tier Nr.	Kontrolle 1 °/oo Äthanol	Tier Nr.	Konzentration [g/ml] 10^{-8}	10^{-7}	$5x10^{-7}$	10^{-6}	10^{-5}	$2x10^{-5}$
6	-7,14 - 3,57	1	+11	+14	+18	± 0	± 0	-
	- -	2	-	-	-	-	-	-
7	± 0 - 9,38	4	-	-	-	-	± 0	-
	-28,13-28,13	8	-	+4	-	-4	-	-
11	-4,71 + 25 +4,17 - 8,33	$\bar{x}$	(+11)	+9	(+18)	-2	± 0	-
		3	-	-	-	-	-	-
12	-3,13 +21,88 +56,25 +34,38	5	-	-	-	-	-	-17
		9	-	-	-	-	-13	-
	$\bar{x}$ + 3,55 x_M - 3,35 s ±23,41	10	-	-	-	-	-	-4
		$\bar{x}$	-	-	-	-	(-13)	-11

Tab. 15 : Dosis-Wirkungsbeziehungen von Cucurbitacin-Glykoside

Änderungen der Kontraktionskraft in Prozent der Ausgangswerte

ier Nr.	Konzentration [g/ml]								
	$5x10^{-5}$	10^{-4}	$2x10^{-4}$	$5x10^{-4}$	10^{-3}	$2x10^{-3}$	$5x10^{-3}$	10^{-2}	
1	+7	-	-	-	-	-	-	-	Elaterinid (Colocynthis)
2	-26	-43	-	-	-	-	-	-	
4	± 0	-4	-	-48	-76	-100	-	-	
8	-	-	-32	-	-68	- 77	-	-	
x	-6	-24	(-32)	(-48)	-72	- 89	-	-	
3	-	-39	-	-	-75	- 82	-100	-	"E I_H" (Gratiola)
5	-27	-60	-61	-	-	-	-	-	
9	-49	-	-59	-	-	-	- 78	-100	
0	-	-	-	-40	-60	- 73	-	-	
x	-38	-50	-60	(-40)	-68	- 78	- 89	(-100)	

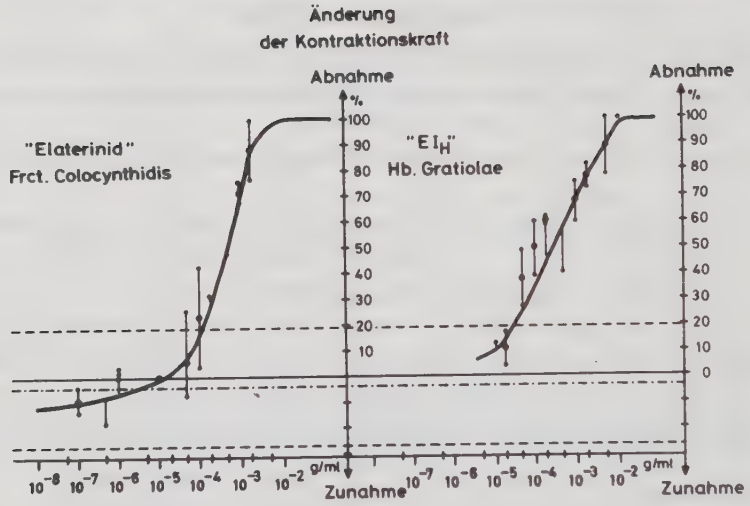


Abb.52 : Dosis - Wirkungskurven von C o l o c y n t h i s - und G r a t i o l a - Extrakten (isoliertes Meerschweinchenherz)

Ordinate: Negativ-inotrope Wirkung in Prozent des maximalen Effektes (= Herzstillstand durch Asystolie)

Abszisse: Konzentration in Gramm Extrakt pro Milliliter Perfusionslösung (logarithmisch)

Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert

Ansteigende Konzentration der Extrakte wurden in 10minütigen Intervallen für jeweils 6 Minuten perfundiert.

—•—•— Mittelwert der Kontrollen mit 1 °/oo Äthanol

– – – – Standardabweichung

Perfusionsdauer max. 60 min., Intervalle wie oben.

7.3. Diskussion der in Abschnitt 7 erhaltenen Ergebnisse

Es wurden sowohl Extrakte verschiedener Polarität als auch Substanzen mit vermuteter cardiotoner Wirkung am isolierten Meerschweinchen-Herzen nach der LANGENDORFF-Methode getestet. Keiner der Extrakte aus G r a t i o l a zeigte dabei nach gründlicher Analyse Effekte, die dem Wirkungsbild der Herzglykoside entsprachen. Vielmehr ergab sich recht eindeutig, daß die durch G r a t i o l a - Extrakte hervorgerufenen Veränderungen der Herzfunktionen auf die in G r a t i o l a vorkommenden Cucurbitacine zurückzuführen sind. Folgende Veränderungen erscheinen charakteristisch: Verminderung von Kontraktionskraft und Frequenz sowie Erhöhung des koronaren Durchflusses.

Die mehrfach (KRUG 1934; BOHINC, KORBAR-SMID 1969) in der Literatur erwähnte Toxizität der G r a t i o l a, die zum Tod der Versuchstiere durch systolischen Herzstillstand führen soll, kann nach unseren Befunden in dieser Form nicht bestätigt werden.

Wie die Abb. 53 zeigt, besteht ein deutlicher Unterschied zwischen den durch einen G r a t i o l a - Extrakt und dem durch k-Strophanthin-ß verursachten Herzstillstand. Die negativ-inotropen Wirkungen der G r a t i o l a - Extrakte lassen sich im übrigen durch Gabe von Herzglykosiden und Noradrenalin aufheben, was vielleicht Rückschlüsse auf den Wirkungsmechanismus erlaubt.

Legende zu Abb. 53 :

Stillstand des isolierten perfundierten Meerschweinchenherzens nach Gabe von "E I_H" (Gratiola), k-Strophanthin-ß und "Elaterinid" (Colocynthis)

ad A) Wirksamkeit steigender Konzentrationen des Chloroform-Extraktes "E I_H" aus G r a t i o l a

↑ 10^{-4} g/ml ↑ 10^{-3} g/ml ↑ $2x10^{-3}$ g/ml ↑ $5x10^{-3}$ g/ml

↓ Ausspülen mit Tyrodelösung bis Plateau erreicht

ad B) Systolischer Herzstillstand durch k-Strophanthin-ß - Toxischer Effekt der Herzglykoside

↑ $2x10^{-5}$ g k-Strophanthin-ß pro ml Perfusionsmedium

Zeit zwischen 1, 2, 3 und 4 jeweils zwei Minuten

ad C) Effekte und deren Reversibilität - Perfusion toxischer Konzentrationen eines "Elaterinid"-Präparates aus C o l o c y n t h i s

↑ 10^{-3} g/ml

↓ Ausspülen mit Tyrodelösung

↑ $2x10^{-3}$ g/ml

Nach Ausschnitten aus Original-Aufzeichnungen (Versuche 3/77, 4/77 u. 7/K vom November und Dezember 1977)

Aufzeichnungen bei verschieden schnellem Papiervorschub

KK = Kontraktionskraft

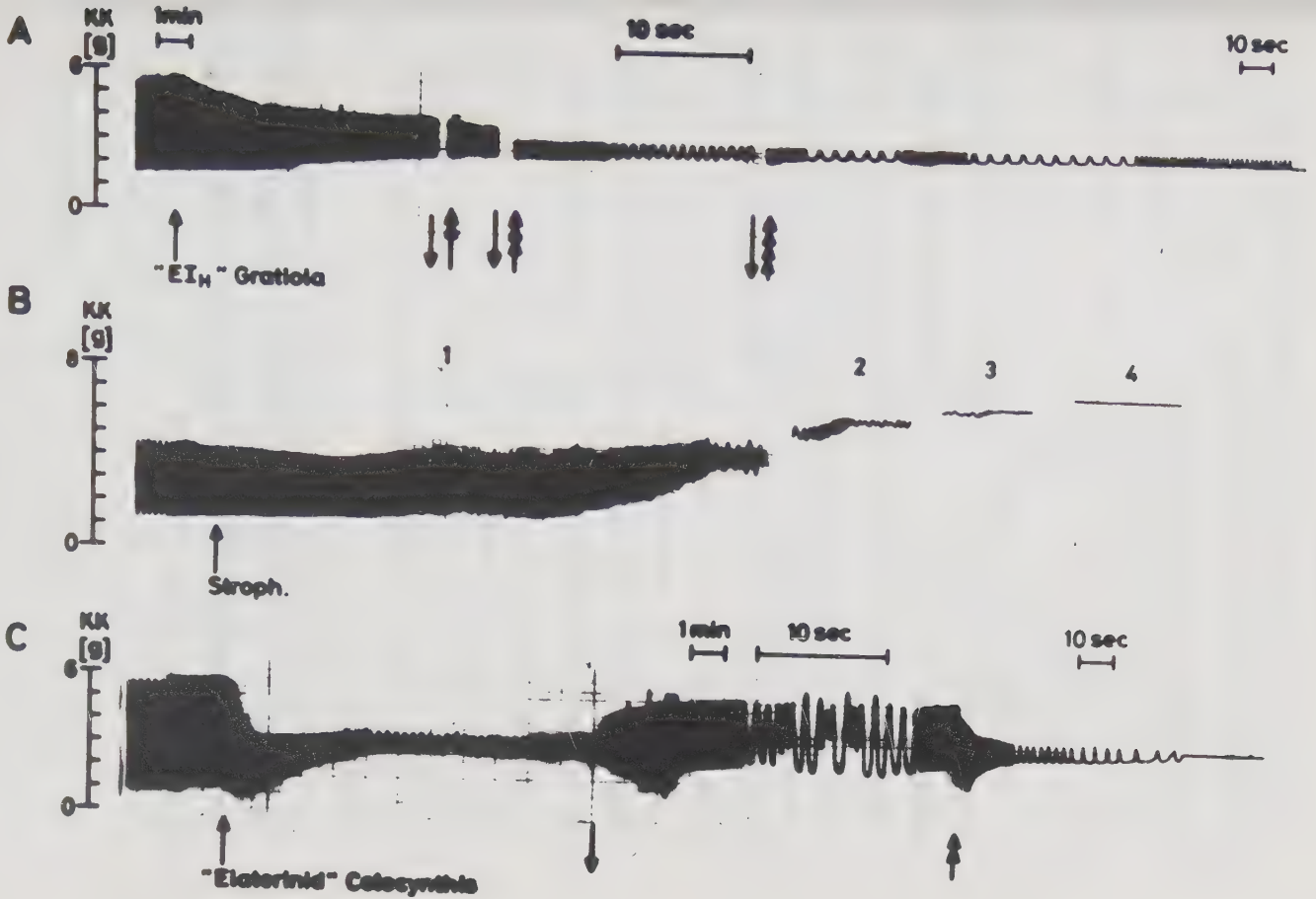

A
KK [g]
6
0
1min
10 sec
10 sec
"EI$_H$" Gratiola
B
KK [g]
8
0
1
2
3
4
Steph.
C
KK [g]
6
0
1min
10 sec
10 sec
"Elaterinid" Colocynthis

Abb. 53

Eine Ursache für die unterschiedlichen Befunde über die Art des Herzstillstandes sehen wir darin, daß alle früheren Untersuchungen an Fröschen vorgenommen wurden und man die Effekte nur visuell feststellte. Unter diesen Umständen erscheint es möglich, daß ein Herzstillstand in Systole beobachtet werden konnte.

Ein anderer Punkt verdient ebenfalls noch Erwähnung: Nach den Mengen zu urteilen, die für einen Herzstillstand notwendig sind, glauben wir, daß die Wirkung auf das Herz nur sekundärer Natur ist. Bei der Prüfung am ganzen Tier wird die primäre Todesursache wohl durch zentrale Effekte oder, wahrscheinlicher, durch Atemlähmung infolge eines Lungenödems erfolgen. Insofern befinden sich die Angaben über Vergiftungserscheinungen durch G r a t i o l a (s. bei HEGI 1968), die durch KRUG (1934) ermittelte hohe Toxizität am Frosch und die Befunde von EDERY u. Mitarb. (1961) mit unseren Ergebnissen im Einklang. Leider wissen wir nicht, wie die Angaben von BILLON (zit. nach Chem. Abstracts 67, 5698) (1967) in diese Befunde einzureihen sind, der für eine aus G r a t i o l a isolierte Substanz eine starke abführende Wirkung (30 mg/kg) bei g e r i n g e r Toxizität (LD_{50} = 450 mg/kg) angibt (Versuchstier ?).

Zusammenfassend läßt sich die cardiale Wirksamkeit von Elaterinid als dem mengenmäßig bedeutensten Cucurbitacinglykosid in Gratiola etwa wie in der Abb. 54 (S. 159) darstellen.

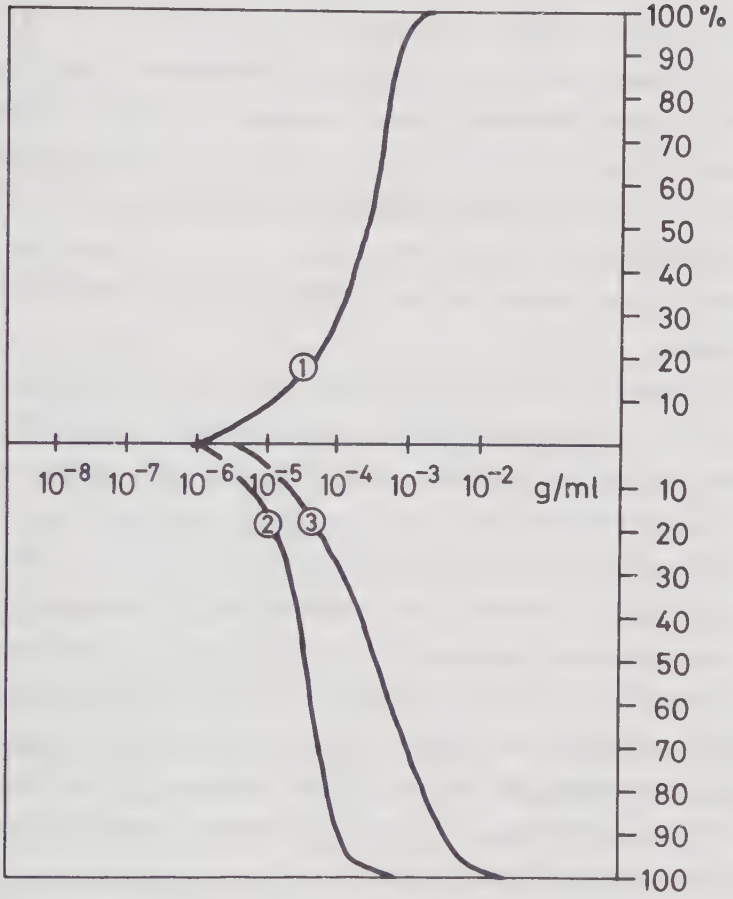


Abb. 54 : Wirkungs-Diagramm von Elaterinid auf Parameter der Herzfunktion (schematisch)

Abszisse: Konzentration an Elaterinid im Perfusionsmedium
Ordinate: Wirkung in Prozent des maximalen Effektes (nach 5 min)

1 Koronardurchfluß
2 Herzfrequenz
3 Kontraktionskraft

Die Herzfrequenz sinkt bis zu fünfzig Prozent des Ausgangswertes ab und der Koronardurchfluß wird im Durchschnitt bis zu sechzig Prozent erhöht, was etwa an die Wirksamkeit handelsüblicher Weißdorn-Präparate heranreicht. Diese Wirkungen treten bereits bei Konzentrationen ein, in denen die Kontraktionskraft weniger als fünfzig Prozent gesenkt ist. Damit erscheinen die eingangs erwähnten Indikationen für I b e r i s , nervöse Herzaffektionen und Angina pectoris (SCHMIDT 1952, STIEGELE 1954), begründet.

Die bei allen cucurbitacin-haltigen Drogen beobachteten drastischen abführenden Wirkungen scheinen mehr auf lokaler Reizung zu beruhen. Inwieweit die Cucurbitacine Einflüsse auf den Ionenhaushalt nehmen, bleibt noch zu untersuchen.

Als Fazit dieses Abschnittes läßt sich feststellen, daß das Gnadenkraut von Pharmakologen eingehend geprüft werden sollte, auch wenn es keine Herzglykoside enthält. Daß es heute obsolet ist, resultiert vielleicht doch nur aus der in der Literatur häufig wiederkehrenden Angabe, daß sein Gebrauch zu starker sexueller Erregung führen kann, eine Tatsache, die nach Meinung von SCHULZ (1907) vor allem für das Mißtrauen gegen seine Anwendung verantwortlich ist.

Auch die Arbeiten von EDERY u. Mitarb. (1961) sowie die der Arbeitskreise von JITARIU und ALEXA (1944, 1948, 1949) lassen hoffen, daß für die Cucurbitacine außer ihrer cytotoxischen Aktivität auch noch andere pharmakologische Wirkungen nachgewiesen werden, die vielleicht eines Tages therapeutisch genutzt werden können; dies entspräche einer heutzutage häufiger zu beobachtenden allgemeinen Tendenz.

8. Zusammenfassung der Ergebnisse

1) Eine der wesentlichen Aufgaben dieser Arbeit bestand darin, widersprüchlichen Literaturangaben über ein Vorkommen von Cardenoliden in Herba Gratiolae (G r a t i o l a o f f i c i n a l i s L., S c r o p h u l a r i a c e a e) nachzugehen. Zu diesem Zweck wurden wäßrig-alkoholische Auszüge von aus dem Handel stammendem Drogenmaterial (mit gesicherter Identität !) mit den üblichen Methoden papier-, dünnschicht- und säulenchromatographisch untersucht und auf Cardenolide geprüft. Darüberhinaus konnten fraktionierte Extrakte am LANGENDORFF-Herzen auf eine Herzwirksamkeit getestet werden.

Cardenolide waren weder durch die chromatographischen noch durch die pharmakologischen Prüfungen nachzuweisen. Vielmehr wurde bestätigt, daß die in früheren Arbeiten als Cardenolide interpretierten glykosidischen G r a t i o l a -Inhaltsstoffe der Gruppe der Cucurbitacine (d.s. sauerstoffreiche C_{30}-Steroide vom Steroid-Lanosterin-Typ mit einer Methylgruppe am C-Atom C-9) angehören. Insbesondere konnte gezeigt werden, daß "Gratiotoxin" mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit mit Elaterinid (= Cucurbitacin E-Glucosid) identisch ist; die cardiotoxische Wirksamkeit des "Gratiotoxins" konnte man für Elaterinid am isolierten Herzen bestätigen, jedoch nur insofern, als es bei der Perfusion von hohen Dosen (ca. $5 \cdot 10^{-3}$ g/ml) Elaterinid ebenfalls zu einem Herzstillstand kam. Die qualitativen Auswirkungen auf verschiedene Parameter der Herzfunktion (Kontraktionskraft, Frequenz, Koronardurchfluß) unterscheiden sich jedoch wesentlich von denen der Cardenolide: Die Herzwirksamkeit der Cucurbitacine

ist (in Dosen von 10^{-6} bis 10^{-3} g/ml Perfusionslösung) durch negative Inotropie und Chronotropie sowie erhöhten Koronardurchfluß gekennzeichnet.

Durch diese Ergebnisse erscheinen auch manche Anwendungen anderer cucurbitacinhaltiger Pflanzenextrakte (z.B. I b e r i s als homöopathisches Mittel gegen bestimmte Herzerkrankungen) in einem neuen Licht.

2) Von den in G r a t i o l a bisher schon nachgewiesenen Cucurbitacinglykosiden konnten wir Desacetyl-Elaterinid (= Cucurbitacin I-Glucosid) erstmalig in nahezu reiner Form durch Säulenchromatographie an Kieselgel isolieren und durch sein chromatographisches Verhalten, optische Drehung und spektroskopische Methoden (UV, IR, MS) charakterisieren. Darüberhinaus wird in dieser Arbeit erstmalig über das Vorkommen von Cucurbitacin L-Glucosid in G r a t i o l a berichtet, das wir, nach enzymatischer Hydrolyse, über seine Spaltprodukte identifizierten.

3) Für einige Cucurbitacine und Cucurbitacinglykoside wurde eine Methode ausgearbeitet, die eine quantitative Bestimmung dieser Substanzen durch "in situ"-Remissionsmessung auf der DC-Platte gestattet. Im Falle des Gratiosid (eines Hauptinhaltsstoffes, der durch Direkt-Auswertung nicht erfaßbar ist) fand man in der Umsetzung mit WASICKY's-Reagenz einen geeigneten Weg, dieses Cucurbitacinderivat spektralphotometrisch (nach dc-Abtrennung) bestimmen zu können.

4) Aus der Handelsdroge isolierten wir durch Säulenchromatographie an Kieselgel in geringen Mengen (etwa 0,0005 %) auch

eine stickstoffhaltige Verbindung ("F 25"), die durch ihren Schmelzpunkt und chromatographische Methoden (DC, GC) charakterisiert wurde. Als Struktur dieser neuen Substanz wird auf Grund der spektroskopischen Daten (UV, IR, MS) ein Chinolizidin-Grundgerüst mit einer Amid-Gruppierung diskutiert.

5) Die Identität der verwendeten, aus dem Handel stammenden Herba-Droge sicherten wir durch mikroskopisch-anatomischen Vergleich mit von uns angebautem Pflanzenmaterial. Dabei ergab sich die Gelegenheit, eine ausführliche Beschreibung sowohl der oberirdischen als auch der unterirdischen Teile des Gnadenkrautes anzufertigen. Des weiteren werden Erfahrungen über den Anbau von G r a t i o l a mitgeteilt und Angaben gemacht über den durchschnittlichen Ertrag an oberirdischen Teilen (2,2 kg Frischmaterial bzw. 600 g Herba-Droge pro Quadratmeter Anbaufläche).

Zur Gewinnung von Herba-Droge wird als günstigster Erntezeitpunkt die Periode kurz nach dem Aufblühen (zweite Junihälfte) empfohlen. Die durch Trocknung bei Raumtemperatur hergestellte Herba-Droge wies einen Gehalt von etwa 1,5 Prozent (Cucurbitacin E, I und ihre Glucoside) auf (Wurzeln und Rhizome, nach Absterben der oberirdischen Teile geerntet, zeigten nach Trocknung bei 40 °C einen Gehalt von etwa 0,6 Prozent).

6) Durch Untersuchungen über die Veränderungen des Cucurbitacin-Spektrums während einer Vegetationsperiode hofften wir, Aufschluß über biosynthetische Zusammenhänge innerhalb der Cucurbitacine zu erhalten. Elaterinid erwies sich dabei als das

mengenmäßig bedeutendste Cucurbitacinglykosid, das auch zuerst gebildet wird. Im Verlauf des Sommers entstehen aus ihm durch Desacetylierungs- und Hydrierungsreaktionen Desacetyl-Elaterinid und Cucurbitacin L-Glucosid. Desacetyl-Elaterinid tritt immer zusammen mit Elaterinid auf, doch variiert deren Verhältnis je nach Vegetationsperiode ziemlich stark. Cucurbitacin L-Glucosid dürfte erst zu einem späteren Zeitpunkt gebildet werden, gleiches gilt für die Gratiogenin-Derivate. Es liegen also Verhältnisse vor, die man mit den bei C u c u r b i t a c e e n gefundenen vergleichen kann.

Aglyka findet man in der getrockneten Pflanze nur in geringer Menge. In zerkleinertem Frischmaterial jedoch entstehen sie u.U. sehr schnell aus den nativ vorhandenen Glykosiden durch die Einwirkung von Enzymen (Elaterase), die durch das Zerkleinern freigesetzt wurden. - Auffallend bei unseren Untersuchungen war, daß die Aktivität dieser Elaterase offenbar eng mit bestimmten Entwicklungsstadien der Pflanzen korreliert: Die höchste Aktivität fand man zur Zeit der Hochblüte. Diese Ergebnisse waren für uns Anlaß, Überlegungen zur Funktion der Cucurbitacine in der Pflanze anzustellen. Möglicherweise spielen sie eine Rolle bei der Befruchtung.

7) G r a t i o l a -Sprosse, die wir aus Gewebekulturen regenerierten, enthielten die Phytosterole Campesterol, Stigmasterol und Sitosterol. In einer Probe mit geringerem Phytosterol-Gehalt konnte außerdem in geringen Mengen Elaterinid nachgewiesen werden, was Umwandlungen von Phytosterolen in Cucurbitacine möglich erscheinen läßt.

8) G r a t i o l a o f f i c i n a l i s L. nimmt - einmal durch das Fehlen von Iridoiden (vgl. KWASNIEWSKI 1978), Triterpensaponinen und Cardenoliden, zum anderen durch das Vorkommen von Cucurbitacinen - innerhalb der S c r o p h u l a r i a c e e n eine Sonderstellung ein; unterstrichen wird dies noch durch einige morphologisch-anatomische Merkmale, die Verwandschaftsbeziehungen zu den L a b i a t a e andeuten (z.B. Drüsenschuppen vom L a m i a c e e n -Typ). Inwieweit die Führung von Cucurbitacinen (innerhalb der S c r o p h u l a r i a c e e n ohne weiteres Beispiel) als ursprüngliches oder abgeleitetes chemisches Merkmal zu werten ist, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht abgeschätzt werden. Erst wenn man Cucurbitacine in weiteren Familien entdeckt, wird man sagen können, ob sich die Cucurbitacine innerhalb der großen Ordnung der (systematisch noch nicht restlos befriedigend aufgeteilten) T u b i f l o r a e s. l . einmal als chemotaxonomisches Klassifizierungsmerkmal eignen werden.

EXPERIMENTELLER TEIL

9. Experimenteller Teil

9.1. Ernte und Konservierung des Untersuchungsmaterials

Bei der Ernte des Frischpflanzenmaterials wurde den Kriterien, die im Entwurf zum neuen HAB (Manuskript 1977) aufgestellt sind, Rechnung getragen.

Die oberirdischen Teile wurden jeweils in der Zeit zwischen 11^{00} und 13^{00} Uhr etwa 2 cm über dem Boden abgeschnitten und sofort gewogen. Die weitere Aufarbeitung (s. Abschn. 9.6.1.) zur Gehaltsbestimmung erfolgte zügig.

Zur Gewinnung der Droge wurden die unzerschnittenen krautigen Teile im Umlufttrockenschrank [1] bei Raumtemperatur 3 Tage getrocknet. Damit fanden sowohl die Befunde von FUCHS u. Mitarb. (1960) über die günstigste Trocknungsart für cardenolidglykosid-haltige Drogen als auch die Untersuchungen von DARWISH-SAYED u. Mitarb. (1974) über die Trocknung cucurbitacinglykosid-haltiger Drogen Berücksichtigung.

Anschließend erfolgte eine viertägige Nachtrocknung im Exsiccator über Blaugel.

Zur weiteren Aufbewahrung wurden entweder die ganzen Pflanzenteile in Papiertüten bei 15 - 20 °C gelagert oder, für die quantitativen Bestimmungen, mit einer RETSCH-Mühle (Typ SK 1) [2] grob gepulvert und anschließend in dicht verschlossenen Glasgefäßen vor Licht geschützt aufbewahrt.

---

1) HERAEUS, Typ TU 1
2) RETSCH KG, Haan

Die unterirdischen Teile (Rhizome und Wurzeln) wurden gegen Ende der Vegetationsperiode (Anfang Oktober) ausgegraben, gewaschen und bei 40 °C getrocknet. Die weitere Behandlung war die gleiche wie bei den krautigen Teilen.

9.2. Methoden der qualitativen phytochemischen Analyse

Die Prüfung von Drogen und Extrakten auf die wichtigsten Wirkstoffgruppen erfolgte nach den allgemein anwendbaren Prüfungsvorschriften wie sie WICHTL (1971) angibt. Nur in wenigen Fällen wurden andere als die dort vorgeschriebenen Mengen eingesetzt.

Feste Extrakte erfuhren die gleiche Aufarbeitung wie Drogenpulver. Von flüssigen Zubereitungen kam in der Regel die zehnfache Menge zum Einsatz; mit dem Eindampfrückstand wurde, wie bei den Drogenpulvern angegeben, verfahren.

Alle Reaktionen wurden an Drogen, die die zu prüfenden Wirkstoffe bekanntermaßen enthalten, getestet. Den Ausfall der Prüfungen unbekannter Proben beurteilte ich im Vergleich mit diesen Testversuchen. - Zu Einzelheiten der Durchführung der Nachweise s. WICHTL (1971).

9.3. Allgemeine Methoden zur Isolierung und Identifizierung von Verbindungen in den Extrakten

9.3.1. Aufarbeitung und Extraktion des Untersuchungsmaterials

a) Methode 1

250 g grob gepulverte Droge werden mit 2,5 l siedendem 70proz. Alkohol 15 Minuten unter Rückfluß extrahiert. Nach dem Abkühlen wird filtriert; Drogenrückstand und Filter werden nochmals mit 1 l 70proz. Alkohol 15 Minuten gekocht und nach dem Erkalten abfiltriert. Die vereinigten Extraktlösungen werden unter vermindertem Druck auf etwa ein Drittel ihres Volumens eingeengt.

Zur Entfernung des Chlorophylls wird mit 150 ml Petroläther (Siedebereich 40 - 60 °C) ausgeschüttelt; die Petrolätherphase wird mit 100 ml 50proz. Alkohol zurückgeschüttelt. Das Volumen der vereinigten wäßrig-alkoholischen Phasen ergänzt man mit Wasser auf 2,5 l. Durch Zugabe eines Überschusses an 10proz. neutraler Blei-II-acetatlösung (etwa 450 ml) werden Gerbstoffe und Flavonoide ausgefällt. Aus dem Filtrat entfernt man überschüssige Bleiionen durch Zugabe einer 10proz. Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung (etwa 250 ml) (vgl. dazu 4.2., Seite 43).

Das intensiv orange-gelb gefärbte Filtrat engt man am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck auf etwa 800 ml ein; dabei scheidet sich an der Kolbenwandung eine braune, harzartige zähe Masse ab, die verworfen wurde, da sie den Trockenextrakten (siehe 9.3.2.) eine klebrige Konsistenz verleiht.

Das eingeengte Filtrat extrahiert man dreimal mit je 300 ml Chloroform. Die wäßrige Phase wird mit 40 g $Na_2SO_4 \cdot 10\ H_2O$ versetzt und anschließend dreimal mit je 300 ml Chloroform-Isopropanol (3+2) ausgeschüttelt.

Aus den organischen Phasen erhält man, wie unter 9.3.2. beschrieben, die entsprechenden Trockenextrakte, die durch diese Aufarbeitung in 0,8 % (Chloroform-Extrakt), bzw. 1,2 % (Chloroform-Isopropanol (3+2)-Extrakt) Ausbeute gewonnen werden konnten.

Methode 1 fand vorwiegend Verwendung zur Herstellung von Extrakten zur qualitativen chromatographischen Untersuchung.

Bei Drogenteilen, aus denen kein Chlorophyll entfernt werden muß, kann die Petroläther-Extraktion unterbleiben.

Sollen nur Cucurbitacin-Aglyka und Monoglucoside extrahiert werden (z.B. zum dc-Nachweis oder zur Isolierung der Glucoside aus Koloquinthen), reicht es aus, die gereinigte wäßrig-alkoholische Lösung mit Chloroform-Äthanol (3+1) auszuschütteln.

b) Methode 2

Durch diese Methode wurden jene Extrakte gewonnen, mit denen ein Teil der pharmakologischen Untersuchungen sowie die Isolierung von Substanzen durch Säulenchromatographie durchgeführt wurden (Extrakte E I_H und E II_H). Die Veränderungen gegenüber der Methode 1 sind nicht das Ergebnis systematischer Untersuchungen über die beste Extraktionsart, sondern sie erfolgten aus arbeitstechnischen Gründen.

Das Ausgangsmaterial bildete ein Fluidextrakt, der aus 5 kg Handelsdroge (siehe S. 15) durch Reihenperkolation mit 75prozentigem (g/g) Methanol hergestellt worden war +). Ein Gewichtsteil dieses Fluidextraktes entsprach einem Teil Droge. Der Extraktgehalt betrug 12,5 %.

2,5 kg dieses Fluidextraktes (= 2,5 kg Droge) wurden am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck bei 50 °C weitgehend eingeengt. 8,4 g einer chlorophyllhaltigen, viskosen Masse, die sich beim Einengen zuerst abschied, wurde durch Dekantieren abgetrennt. Der Überstand ergab nach Eindampfen 400 g eines zähen dunkelbraunen Extraktes. Diesen löste man bei 50 °C mit 630 ml 50proz. Methanol und versetzte mit 1200 ml (leichter Überschuß) einer 10proz. wäßrigen Lösung von neutralem Blei-II-acetat. Die entstandene Fällung wurde abfiltriert, der Niederschlag auf einer Nutsche zweimal mit je 125 ml Methanol (50proz.) gewaschen. Die vereinigten Filtrate extrahierte man achtmal mit je 500 ml Chloroform.

Die verbleibende wäßrige Phase wurde anschließend achtmal mit insgesamt 4 l Chloroform-Isopropanol (3+2) ausgeschüttelt.

Die organischen Auszüge wurden nach 9.3.2. zu stark bitter schmeckenden, grün-gelben ($E\ I_H$) bzw. gelb-braunen ($E\ II_H$) pulverigen Trockenextrakten verarbeitet. - Die Ausbeuten betrugen 0,45 % ($E\ I_H$) bzw. 0,9 % ($E\ II_H$) der eingesetzten Menge an Fluidextrakt.

+) Der Firma CHEMISCHE FABRIK DR. HETTERICH, Fürth, sind wir für die kostenlose Herstellung des Extraktes zu großem Dank verpflichtet.

9.3.2. Herstellung von Trockenextrakten

Die bei den voranstehend beschriebenen Extraktions- und Reinigungsverfahren erhaltenen organischen Phasen trocknete man über wasserfreiem Natriumsulfat und brachte sie am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck bei 50 °C nicht übersteigenden Badtemperaturen zur Trockne. Dabei blähten sich die Extrakte im zähflüssigen Zustand zum Teil stark auf.

Die trockenen, pulverigen Extrakte bezeichnete man je nach Herkunft und Aufarbeitung mit E I (Chloroform-Extrakt) und E II (Chloroform-Alkohol-Extrakt) und versah sie mit entsprechenden, als Index gesetzten Buchstaben.

Durch Säulenchromatographie oder präparative Schichtchromatographie erhaltene Substanzlösungen wurden im wesentlichen auf die gleiche Art in trockenen Zustand überführt. Hierbei erwies es sich jedoch des öfteren als überaus schwierig, die konzentrierten Lösungen zur Trockne zu bringen. Man behalf sich dann mit wiederholtem Zusatz von Petroläther, Äther, Äthylacetat oder Aceton, die allein oder in Kombination zur Ausfällung oder Auskristallisation führten. Manchmal reichte es auch aus, den Kolben einige Zeit bei Raumtemperatur zu evakuieren und dann plötzlich in das 50 °C warme Wasserbad abzusenken.

Die trockenen Extrakte wurden im evakuierten Exsiccator über Blaugel aufbewahrt.

9.3.3. Chromatographische Methoden

9.3.3.1. Sprühreagenzien

Trichloressigsäure - Chloramin nach JENSEN (1953)

Man löst 3,75 g Trichloressigsäure in 15 ml Äthanol und fügt die Lösung von 30 mg Chloramin T in 1 ml Wasser zu.

Nach dem Besprühen erhitzt man die Chromatogramme 5 bis 10 Minuten auf 120 °C.

Das Reagenz wurde nur zum Sichtbarmachen von Substanzflecken auf Papierchromatogrammen eingesetzt (Cardenolid-Screening; s. Seite 46). - Cucurbitacine des Diosphenol-Typs zeigen gelbe Färbung und Fluoreszenz (UV 365 nm).

Antimontrichlorid nach LAWDAY (1952)

Man besprüht mit einer Lösung von 2 g $SbCl_3$ in 10 ml Chloroform und erhitzt sofort 3 Minuten auf 105 °C.

Diosphenol-Cucurbitacine geben gelb-rote Flecken, die sehr schnell in Blaugrau übergehen. Auf DC-Platten verblassen die Farben rasch.

Dinitrobenzoat nach KEDDE (1947)

Die Chromatogramme werden nacheinander mit einer 2proz. Lösung von 3,5-Dinitrobenzoesäure in Äthanol (unvergällt !) und mit 2 N methanol. Kalilauge besprüht. - Cardenolide ergeben eine blau-violette Färbung.

LIEBERMANN - BURCHARD

Gemisch aus 10 Teilen Essigsäureanhydrid und 1 Teil konzentrierter Schwefelsäure. - Δ^5-Sterole färben sich nach etwa 3 Minuten bei 110 °C blau-violett, Δ^7-Sterole und Triterpene braun.

Eisen-III-chlorid

Die Chromatogramme werden mit einer 5proz. äthanol. Lösung von $FeCl_3$, der 1 % konz. HCl zugesetzt ist, bis zur leichten Gelbfärbung der Schicht besprüht. Die Farben entwickeln sich innerhalb von 2 Minuten. - Cucurbitacin-Aglyka des Diosphenol-Typs erscheinen braun-violett.

Vanillin-Phosphorsäure

Man löst 2 g Vanillin in 100 ml eines Gemisches aus 80 Teilen Phosphorsäure (84 %) und 20 Teilen Äthanol.

Nach dem Besprühen erhitzt man Papierchromatogramme 15 Minuten, Dünnschichtchromatogramme 3 - 5 Minuten auf 120 °C.

Cucurbitacine mit ungesättigter Seitenkette ergeben violettrote bis violett-braune Flecken, die unter UV-Licht (365 nm) rot fluoreszieren. Verbindungen ohne Doppelbindung in der Seitenkette erscheinen gelb mit gelb-grüner Fluoreszenz.

Das Reagenz wurde vornehmlich in Kombination mit dem $FeCl_3$-Reagenz eingesetzt. Man besprüht zuerst mit der Eisen-III-chloridlösung und dann bis zum Verschwinden der gelben Farbe

mit Vanillin-Phosphorsäure. - Gratiogenin-Derivate zeigen unter diesen Bedingungen eine grüne Färbung, die in gelb übergeht.

Vanillin-Schwefelsäure

Das Reagenz besteht aus einer 2proz. Lösung von Vanillin in konzentrierter Schwefelsäure. Man besprüht die auf 120 °C erhitzten Platten, beobachtet die entstandenen Färbungen und erhitzt weiter bis zur optimalen Farbausbildung. Die für Cucurbitacine erhaltenen Färbungen entsprechen denen, die durch das Vanillin-Phosphorsäure-Reagenz erhalten werden (s.a. Seite 62).

Beim Cardenolid-Screening wurden die mit KEDDE-Reagenz behandelten Chromatogramme auf 120 °C erhitzt, wobei die violette Färbung verschwindet, und dann mit Vanillin-H_2SO_4 besprüht. Es resultierten Flecken, deren Farben etwas unreiner erschienen als dies bei den nur mit Vanillin-Schwefelsäure besprühten Substanzflecken der Fall war.

4-Dimethylaminobenzaldehyd - Reagenz

Die mit $FeCl_3$-Reagenz vorbesprühten Platten werden anschließend mit einer 2proz. Lösung von 4-Dimethylaminobenzaldehyd in einem Gemisch aus 2 Teilen 84proz. Phosphorsäure und 8 Teilen Äthanol übersprüht bis die braunen Flecken verschwunden sind.

Nach 10 bis 20minütigem Erhitzen auf 120 °C erscheinen die Cucurbitacine als anfangs rot-braune Flecken, deren Färbung charakteristisch nach blaubraunen oder rötlichen Tönungen umschlägt; Cucurbitacin L wird gelb, die Gratiogenin-Derivate rosa.

Das Reagenz ist weniger empfindlich als die Vanillin-Reagenzien, in seiner Farbgebung aber charakteristischer.

Xanthydrol - Reagenz nach PESEZ (1952)

0,1proz. Lösung von Xanthydrol in 90 ml Äthanol und 10 ml konzentrierter Salzsäure. - Nach dem Erhitzen auf 120 °C ergeben 2-Desoxyzucker oder diese enthaltende Glykoside rote Fleckzonen.

Aminohippursäure - Reagenz nach SCHEFFER und KIKUTH (1962)

Man löst 0,3 g 4-Aminohippursäure und 3,0 g Phthalsäure in 100 ml Äthanol. Nach dem Besprühen wird 8 Minuten auf 120 °C erhitzt. - Zucker erscheinen je nach Konzentration als gelbe bis gelbbraune Flecken bei Tageslicht oder sind an intensiv gelber Fluoreszenz im UV-Licht bei 365 nm erkenntlich.

DRAGENDORFF's - Reagenz

Mischung von 1 ml "Lösung a" und 1 ml "Lösung b" mit 4 ml Eisessig und 20 ml Wasser.

"Lösung a": 0,85 g bas. Wismutnitrat werden in 40 ml Wasser und 10 ml Eisessig gelöst.

"Lösung b": Lösung von 8,0 g Kaliumjodid in 10 ml Wasser

Zum Nachweis von Alkaloiden.

Zur Empfindlichkeit vgl. RUBIA u. GOMEZ (1977).

Spezifität s. bei ANDERSON u. Mitarb. (1977).

9.3.3.2. Papierchromatographie

Papierchromatographische Trennungen erfolgten auf dem Papier SCHLEICHER und SCHÜLL 2043 b Mgl; das Chromatogrammformat betrug generell 18 x 60 cm, wobei die Startlinie 11 cm vom Rand entfernt war. Die Papierbogen wurden nach Bedarf in Bahnen eingeteilt, meist je 4 Bahnen zu 4,5 cm Breite. Bei Verwendung der Durchlauftechnik schnitt man die unteren Kanten mit einer Zackenschere ab um bei absteigender Entwicklung ein ungehindertes Abtropfen des Fließmittels zu ermöglichen.

Das zum Cardenolid-Screening verwendete Fließmittel Chloroform-Tetrahydrofuran-Formamid (50 + 50 + 6,5) eignete sich bei Laufzeiten von 5 bis 8 Stunden auch zur Trennung der Cucurbitacin-Aglyka auf formamid-imprägniertem (8 Min. in Aceton mit 20 % Formamid) Papier. Zur Auftrennung der Cucurbitacin-monoglucoside mußte man dagegen über einen Zeitraum von mindestens 15 Stunden entwickeln (Durchlaufchromatogramm).

Zur pc-Trennung von Zuckern wurde mit der Oberphase des Gemisches Toluol-Butanol-Wasser (1 + 2 + 2) auf zu 35 % mit Wasser imprägniertem Papier über 50 Stunden chromatographiert (absteigend; Durchlaufchromatogramm).

Glucose: Laufstrecke etwa 4 cm; Rhamnose: Laufstrecke etwa 20 cm.

9.3.3.3. Dünnschichtchromatographie

Die dünnschichtchromatographischen Analysen von Triterpenoiden und Zuckerkomponenten wurden auf Kieselgel GF_{254}-Platten durchgeführt. Wir verwendeten sowohl selbstbeschichtete Platten (hergestellt mit einem Streichgerät der Firma DESAGA) als auch Fertigplatten und Fertigfolien der Firma MERCK.

Zur Auftrennung der Zucker wurden zusätzlich selbstbeschichtete, mit 0,02 mol Natriumacetatlösung imprägnierte Kieselgel GF_{254}-Platten eingesetzt.

Präparative Trennungen, z.B. zur weiteren Anreicherung von Substanzen aus den Säulenfraktionen, erfolgten je nach Trennproblem auf selbstbeschichteten Platten von 0,25 mm oder 0,5 mm Schichtdicke (hier meist Kieselgel HF_{254}) sowie auf Fertigplatten (0,25 mm Schichtdicke). Die Auftragung der Substanzlösungen erfolgte in diesen Fällen als Band über die ganze Breite der Platte (mit einem "Chromatocharger" der Firma CAMAG). Die getrennten Substanzen wurden durch Ansprühen eines Randstreifens sichtbar gemacht, die markierten Zonen ausgekratzt und in kleine Glassäulen gefüllt. Die Elution nahmen wir vornehmlich mit Chloroform-Methanol (1+1) vor.

Chromatographiert wurde in der Regel bei Kammersättigung. Als Standardfließmittel kamen folgende Systeme zum Einsatz:

(Alle Angaben als Volumteile)

Aglyka

System I Chloroform - Äthanol (95 + 5)

Ia Chloroform - Methanol (90 + 10)

Schwach polare Glykoside

System II Chloroform - Methanol (85 + 15)

IIa Chloroform - Äthanol (85 + 15)

III Chloroform-Methanol-Wasser (85 + 14 + 1)

Stärker polare Glykoside

System IV Chloroform-Methanol-Wasser (80 + 19 + 1)

V Dichlormethan-Methanol-Wasser (75 + 23 + 2)

Für spezielle Fragestellungen wurden außerdem noch folgende Fließmittel eingesetzt:

System VI Äthylacetat-Pyridin-Wasser (5+1+4, Oberphase)
für Cucurbitacin-Glykoside (u. Cardenolid-Screening)

System VII Di-isopropyl-äther - Aceton (5 + 2)
für Cucurbitacin-Aglyka
(R_f-Werte allerdings schlecht reproduzierbar; NS, Fließmittel aber mind. 3 Stunden vorher einfüllen).

System VIII Chloroform - Aceton (6 + 1)
für Gratiogenin-Derivate

System IX Äther-Äthylacetat (80 + 20), NS
für acetylierte Glykoside; Aglyka

System X Benzol - Äthylacetat (80 + 20)
für Phytosterole und Triterpene

System XI Äthylacetat-Isopropanol-Methanol (70 + 15 + 15)
für stärker polare Glykoside und für
Zucker: a) Kieselgel GF_{254} (Glucose R_f = 0,65;
auf Fertigplatten am Start)
b) Kieselgel G, imprägniert mit 0,02 mol
Natriumacetatlösung (Glucose R_f = 0,34)

System XII n-Propanol-Äthylacetat-Wasser (70 + 20 + 10)
für Zucker: Glucose (R_f = 0,46)

9.3.3.4. Säulenchromatographie

SC 1 (Cardenolid-Screening; s. Seite 51)

Stationäre Phase: 36 g Kieselgel 60 (MERCK 7734), 0,063 - 0,2 mm, wurden mit 36 g Wasser verrieben und mit wassergesättigtem Äthylacetat luftblasenfrei eingeschlämmt.

Säulendurchmesser: 2,5 cm, Füllhöhe: 25 cm, Glassäule.

Aufgetragen: 2 g Extrakt E II, in möglichst wenig Chloroform-Methanol (1+1) gelöst.

Mobile Phase: Äthylacetat, wassergesättigt, ohne und mit Zusatz von 0,5 % Methanol.

Durchflußgeschwindigkeit: 200 ml/h

Es wurden Fraktionen zu je 50 ml aufgefangen (s. Tab. 4, Seite 51)

SC 2 (Elaterinid-Gewinnung aus Koloquinthen)

Stationäre Phase: 50 g Silica-Gel WOELM (for Dry-Column-Chromatographie), Activity III / 30 mm, F 254; 70 - 230 mesh mit 5 g einer Mischung von Chloroform und 15 % Methanol äquilibriert (nach LOEV u. Mitarb. 1967).

Säulendurchmesser: 2 cm, Füllhöhe: 27 cm, Quarzsäule.

Aufgetragen: Die Lösung von 0,4 g Chloroform-Äthanol (3+1)-Extrakt aus Koloquinthen in 20 ml Chloroform-Methanol (1+1) wurde an 2 g Silica-Gel (s.o.) adsorbiert.

Mobile Phase: 50 ml Chloroform + 15 % Methanol

Laufzeit: 15 Minuten

Detektion: UV-Licht (254 nm)

Die Zone mit Elaterinid (Laufstrecke etwa 8-9 cm) wurde aus der ausgestoßenen Füllmasse ausgeschnitten und mit Chloroform-Methanol (1+1) eluiert.

SC 3 (Vorversuch zur SC an Kieselgel; E II)

Stationäre Phase: 150 g Kieselgel 60, 0,063 - 0,2 mm (70 - 230 mesh ASTM), Akt. 2-3 (MERCK 7754).

Säulendurchmesser: 2,5 cm, Füllhöhe: 60 cm, Glassäule.

Aufgetragen: 1,3 g Extrakt E II, konzentriert gelöst in Chloroform-Methanol (1+1).

Mobile Phase: Chloroform mit steigendem Methanol-Zusatz

Fraktionen zu 20 ml

insgesamt:	Chloroform	:	1 Sammelfraktion
	Chloroform - Methanol (98 + 2)	:	10 Fraktionen
	Chloroform - Methanol (96 + 4)	:	20 Fraktionen
	Chloroform - Methanol (94 + 6)	:	10 Fraktionen
	Chloroform - Methanol (92 + 8)	:	30 Fraktionen
	Chloroform - Methanol (90 + 10)	:	10 Fraktionen
	Chloroform - Methanol (88 + 12)	:	20 Fraktionen
	Chloroform - Methanol (86 + 14)	:	10 Fraktionen
	Chloroform - Methanol (84 + 16)	:	30 Fraktionen

Desacetyl-Elaterinid: Fraktionen 56 - 65

Gratiosid : Fraktionen 85 - 100

SC 4 (Vorversuch zur SC an Kieselgel; E II_n)

Stationäre Phase: 230 g Kieselgel 60 (MERCK 7754), s. "SC 3".

Säulendurchmesser: 3,5 cm, Füllhöhe: 45 cm, Glassäule.

Aufgetragen: ca. 3 g E II_n (nur mit Petroläther gereinigter Extrakt E II, s. Seite 57) in 30 ml Chloroform-Methanol (1+1).

Mobile Phase: Chloroform mit steigendem Methanol-Zusatz

Fraktionen zu 400 ml

insgesamt:

Chloroform	:	2 Fraktionen
Chloroform - Methanol (98 + 2)	:	8 Fraktionen
Chloroform - Methanol (95 + 5)	:	3 Fraktionen
Chloroform - Methanol (90 + 10)	:	2 Fraktionen

Chloroform - Methanol (85 + 15) : 2 Fraktionen
Chloroform - Methanol (80 + 20) : 2 Fraktionen

Desacetyl-Elaterinid: Fraktionen 15 - 16
Gratiosid : Fraktionen 17 - 18

SC 5 (E II_H)

Stationäre Phase: 1,3 kg Kieselgel 60, 0,2 - 0,5 mm (35 - 70 mesh ASTM) für die SC (MERCK 7733), Akt. 2-3, wurden mit Chloroform luftblasenfrei eingeschlämmt und mit insgesamt 15 l Chloroform gewaschen.

Säulendurchmesser: 7 cm, Füllhöhe: 90 cm, Glassäule.
Aufgetragen: 20 g Extrakt E II_H (siehe 9.3.1., Methode 2) in 30 ml Chloroform-Methanol (1+1).
Mobile Phase: Chloroform mit steigendem Methanol-Zusatz
Durchflußgeschwindigkeit: ca. 250 ml/h
Fraktionen zu 1 l
insgesamt:

Chloroform : 14 Fraktionen
Chloroform - Methanol (98 + 2) : 30 Fraktionen
Chloroform - Methanol (96 + 4) : 34 Fraktionen
Chloroform - Methanol (94 + 6) : 56 Fraktionen
Chloroform - Methanol (92 + 8) : 78 Fraktionen
Chloroform - Methanol (90 + 10) : 42 Fraktionen
Chloroform - Methanol (88 + 12) : 36 Fraktionen
Chloroform - Methanol (85 + 15) : 18 Fraktionen
Chloroform - Methanol (70 + 30) : 22 Fraktionen

Desacetyl-Elaterinid: Fraktionen 58 - 92
Gratiosid : Fraktionen 136 - 160

Zur dc-Kontrolle wurde etwa jede 6. Fraktion auf 5 ml eingeengt; 10 µl dieser Lösung wurden in den Systemen III und V untersucht. Nach dem Ausfall dieser Kontrolle kombinierte man die Fraktionen zu Sammelfraktionen und brachte diese zur Trockne (siehe 9.3.2.).

Ausbeuten und Trennungsverlauf s. 4.3.2.

Um den Zeitaufwand für eine solche umfangreiche Chromatographie relativ gering zu halten, mußten die Einrichtungen zum Auffangen der Fraktionen für einen kontinuierlichen Tag- und Nachtbetrieb geeignet sein. Dies erreichten wir durch die nachfolgend beschriebene Geräteanordnung, die es gestattete, Fraktionen beliebig großer Volumina mit einem Fraktomat Y-3 der Firma HAKO aufzufangen, wobei der Fraktomat ausschließlich über das Volumen des Eluates gesteuert wurde.

Hierzu wurde der Fraktionssammler mit einem Flüssigkeitsmelder gekoppelt (s. Abb. 55 u. Abb. 56), der bei Erreichen einer beliebig festzusetzenden Marke ein Umschalten auf das nächste Auffanggefäß ermöglichte. Zu diesem Zweck befand sich in jedem Auffanggefäß ein NTC-Widerstand (Heißleiter), der beim Eintauchen in das Eluat abkühlt und damit den Stromdurchfluß sperrt; dadurch steigt am Eingang einer mit dem NTC verbundenen Relaisschaltstufe die Spannung auf mehr als 1,6 V (Steuerstrom nur wenige µA) an, die Transistoren schalten durch, das Relais zieht an und gibt den zum Weiterschalten des Fraktomaten nötigen Impuls. Die Empfindlichkeit der Schaltstufe ist durch ein Potentiometer zu regeln.

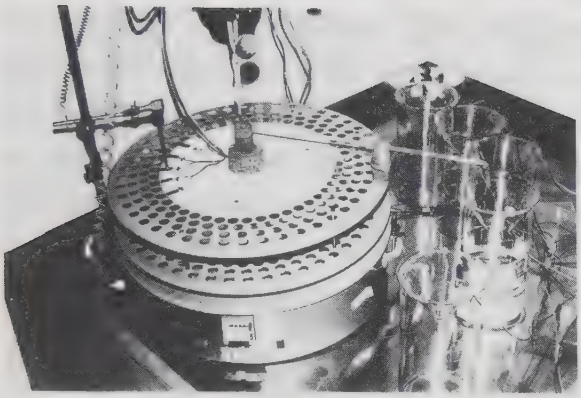


Abb. 55 : Geräteanordnung zur Fraktionensteuerung

Die in Abb. 55 gezeigte Anordnung gewährleistet, daß nur jeweils der betreffende NTC-Widerstand mit der Schaltstufe verbunden ist. - Die Kontaktplatten, über die der Schleifer gleitet, sind aus Kupferfolie.

Die Säule hängt im Zentrum des Drehtisches über einem Trichter mit langem Auslaufrohr (s. Abb. 55). Prinzipiell kann die Länge jedes einzelnen Drehschrittes (und damit Durchmesser und Anzahl der Auffanggefäße) über die Länge (= r) des Auslaufrohres (nach r = U / 2) variiert werden. Da das Rohr in unserem Falle für den zur Verfügung stehenden Raum zu lang

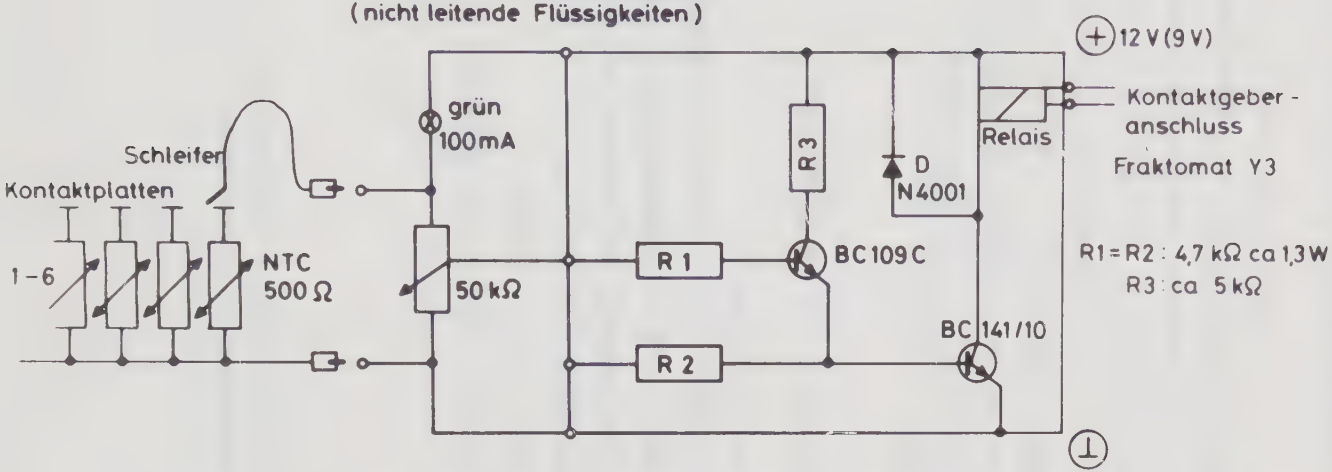
geworden wäre, wurde die Länge der Drehschritte durch eine Manipulation an der Schrittscheibe des Fraktomaten festgelegt.

Um außerdem einen kontinuierlichen Zufluß der mobilen Phase zu bekommen wurde im Vorratsgefäß über der Säule ein Schwimmer angebracht, der über einen Hebel einen Quecksilberschalter betätigte. Wenn sich der Schwimmer durch das fallende Flüssigkeitsniveau senkte, wurde so eine Pumpe eingeschaltet, die aus einem größeren Behälter das Vorratsgefäß auffüllte. Da durch diese Anordnung die Höhe der Flüssigkeitssäule über der Säulenfüllung nur um maximal 5 cm schwankte, konnte die Durchflußgeschwindigkeit relativ konstant gehalten werden.

Die Abbildung 56 auf der folgenden Seite zeigt den Schaltplan von Flüssigkeitsmelder und Fraktionensteuerung.

Flüssigkeitsmelder

(nicht leitende Flüssigkeiten)



Die grüne Lampe im Schaltteil zeigt Funktionsfähigkeit des betreffenden NTC's
Brennen beide grünen Lampen (Schaltteil u. Y3), ist Fraktomat schaltfähig.

9.3.3.5. Gaschromatographie +)

a) Gerät

Verwendet wurde der PERKIN-ELMER Gas-Chromatograph F 22 mit Flammenionisationsdetektor, zusätzlich mit einem Phosphor-Stickstoff-Detektor (PND) bei der Untersuchung der N-haltigen Verbindungen. Als Registriergerät diente ein Zwei-Kanalschreiber (PERKIN-ELMER Recorder 56).

Trägergas war bei allen Analysen nachgereinigter Stickstoff der Fa. Messer/Griesheim. - Der Papiervorschub betrug in der Regel 5 mm / Min.

b) Trennung der freien Sterine (siehe 6.4.)

Säule: Glassäule PERKIN-ELMER

Länge: 2 m innerer Durchmesser: 3 mm

Stationäre Phase: 2,5 % Silicongummi SE-30 auf Chromosorb G, AW-DMCS, 80 - 100 mesh

Strömungsgeschwindigkeit: 32 ml/Min.

Säulentemperatur: 250 °C, isotherm

Temperatur des Einspritzblockes und Detektors: 300 °C

Retentionszeit von Cholesterin: 21 Minuten

+) Frau Dr. W. Wichtl-Bleier danke ich auch an dieser Stelle für die Durchführung der GC-Analysen.

c) Analyse der Stickstoffverbindungen (siehe 4.4.)

Säule und stationäre Phase wie unter b)

Strömungsgeschwindigkeit: 32 ml/Min.

Säulentemperatur: 180 °C, isotherm

PND: 0,75 bar H_2

3,5 bar Luft

600 °C Perlentemperatur

Retentionszeit von "F 25": 5,2 Minuten

bei 200 °C Säulentemperatur: 2,6 Minuten

Zum Vergleich:

Codein R_t = 19,7 Min., 200 °C

R_t = 8 Min., 250 °C

Vorversuche wurden mit den stationären Phasen OV-17 (2,5 %) und Carbowax-KOH (15 % Carbowax 4000 + 3 % KOH auf Chromosorb W, NAW, 80 - 100 mesh) bei verschiedenen Temperaturen unternommen, wobei aber keine befriedigenden Trennbedingungen zu finden waren.

9.3.4. Methoden der Glykosidspaltung

a) Enzymatische Spaltung von Glucosiden

1-2 mg Glucosid löst man in 0,2 ml Wasser, wenn nötig unter Zuhilfenahme von geringen Mengen Äthanol. Eine Lösung von etwa 2 mg LUIZYM® - Konzentrat [1] (Enzymkonzentrat aus A s p e r g i l l u s o r y z a e, auf Abwesenheit von Glucose geprüft) in 0,2 ml Wasser wird der Glucosid-Lösung zugesetzt. Die mit wenig Toluol überschichtete Mischung läßt man für ein oder mehrere Tage bei 35 - 37 °C im Dunkeln stehen.

Durch Zugabe von 5 ml Äthanol wird die Fermentation gestoppt und die Lösung durch Zentrifugieren oder Filtrieren geklärt und im Vakuum zur Trockne gebracht.

Der nach dieser Vorschrift erhaltene Rückstand wurde entweder, in 0,5 ml Chloroform-Methanol (1+1) gelöst, direkt zur Chromatographie verwendet oder, nach vorherigem Lösen in Wasser, mit Chloroform ausgeschüttelt und die Chloroform-Phase zur Prüfung auf Aglykone, die wäßrige Phase zur chromatographischen Identifizierung der Glucose verwendet.

Kamen andere als die genannten Mengen an Substanz bzw. glucosidhaltigen Extrakten zum Einsatz, wurde die Vorschrift entsprechend modifiziert. Statt des genannten LUIZYM® - Konzentrates fanden zum Teil auch andere handelsübliche ß-Glucosidase-Präparate [2] Verwendung.

---

1) Fa. LUITPOLD - Werke, München

2) ß-Glucosidase (Emulsin), Fa. SERVA, Heidelberg
Emulsin, Fa. ROTH, Karlsruhe
Cellulase, Fa. MERCK, Darmstadt

b) Säurehydrolyse von Glykosiden

Von den zu spaltenden Glykosiden wurden etwa 50 mg mit 10 ml 0,2 N Schwefelsäure im siedenden Wasserbad am Rückfluß erhitzt. Der Verlauf der Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Die Reaktion wurde beendet, wenn keine Veränderung des Reaktionsgemisches mehr festgestellt werden konnte, längstens jedoch nach 3 Stunden.

Nach dem Erkalten des Reaktionsansatzes wurden die Aglyka durch mehrfaches Ausschütteln mit Chloroform entfernt. Die vereinigten Chloroform-Auszüge wurden durch Waschen mit Wasser von restlicher Säure befreit und über Natriumsulfat sicc. getrocknet; die nach dem Abdampfen des Chloroforms am Rotationsverdampfer verbliebenen Rückstände benutzte man für die weiteren Analysen.

Die schwefelsaure wäßrige Phase neutralisierte man mit Bariumhydroxidlösung, engte nach Abnutschen des Bariumsulfates auf etwa die Hälfte des ursprünglichen Volumens ein und führte damit die chromatographischen Nachweise (siehe 9.3.3.) der Zucker durch.

9.3.5. Herstellung von Derivaten

a) Acetylierung

Etwa 100 mg Substanz wurden in einer Mischung aus 2 ml Pyridin und 1 ml Essigsäureanhydrid gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach Zusatz von etwa 3 ml Methanol zieht man das Lösungsmittel unter Vakuum ab und

beseitigt Pyridinreste durch Aufbewahren im Vakuum-Exsiccator. Bei kleineren Ausgangsmengen wurde die Vorschrift entsprechend abgeändert.

b) Hydrolytische Abspaltung von Acetylgruppen

2,5 - 10 mg Kaliumhydrogencarbonat, in 0,05 - 0,2 ml Wasser gelöst, gibt man zur Lösung von 0,5 - 2 mg Substanz in 0,2 - 0,5 ml Methanol. Die Mischung läßt man ein bis max. 5 Tage bei Raumtemperatur stehen. Zur chromatographischen Prüfung wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei Raumtemperatur entfernt und der Rückstand mit Chloroform oder Chloroform-Äthanol (3+1) extrahiert.

9.3.6. Bestimmung der physikalischen Kennzahlen

Die Schmelztemperatur wurde mit dem Mikroskopheiztisch 350 der Firma LEITZ ermittelt. Die Schmelzpunkte sind unkorrigiert angegeben.

Zur Bestimmung der spezifischen Drehung (mit dem Kreispolarimeter $0{,}01^{\circ}$ der Firma ZEISS) wurden etwa 5 mg Substanz genau gewogen und in 2,0 ml Chloroform oder Äthanol 96 % gelöst.

Vor den Analysen wurden die Substanzen im Hochvakuum getrocknet.

9.3.7. Spektroskopische Methoden

a) UV - Spektren

Die UV-Absorptionsspektren wurden mit einem selbstregistrierenden Zweistrahl-Spektralphotometer der Firma PERKIN ELMER (Modell 124) aufgenommen.

Zur Ermittlung der Extinktionskoeffizienten wurden Konzentrationen von etwa 1 mg Substanz (genau gewogen) in 25,00 ml Methanol (zur Spektroskopie) vermessen.

Wahlweise gelangte als Lösungsmittel auch Äthanol 96 % (DAB-Qualität) zum Einsatz.

Wird bei den Spektren der Cucurbitacine als Lösungsmittel "alkohol. NaOH" angegeben, dann erfolgte ein Zusatz von 3 Tropfen 0,1 N Natronlauge zur alkoholischen Meßlösung.

b) IR - Spektren

Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgte mit dem Infrarot-Spektrophotometer 700 der Firma PERKIN ELMER.

Standen nur geringe Substanzmengen zur Verfügung, wurden Preßlinge mit Hilfe von Bleireduzierringen hergestellt (0,2 mg bis 0,6 mg Substanz / 50 mg KBr).

c) FD - Massenspektren +)

Die Felddesorptions-Massenspektren wurden mit dem Gerät VARIAN - MAT 711 angefertigt. Hierzu wurden die Substanzen

---

+) Herrn Dr. STEINBACH vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg danke ich für die Aufnahme der Spektren.

als möglichst konzentrierte Lösungen in leicht flüchtigen Lösungsmitteln auf mit Benzonitril aktivierte Wolframfäden von 10 µm Durchmesser aufgebracht und bei unterschiedlichen Fadentemperaturen verdampft.

d) EI - Massenspektren +)

Die Aufnahme der Spektren wurde mit dem ATLAS - Massenspektrometer CH 7 bei Einlaßtemperaturen zwischen 150 °C und 250 °C und bei Ionisierungsenergien von 12 eV, 38 eV und 70 eV durchgeführt.

9.4. Gewinnung von Vergleichssubstanzen (Elaterinid und Desacetyl-Elaterinid)

150 g Fructus Colocynthidis cum semine (pulv.) arbeiteten wir nach Methode 1 (siehe 9.3.1.) auf. Den Rückstand des Chloroform-Äthanol (3+1)-Extraktes löste man in 40 ml Chloroform und versetzte anschließend mit 10 ml Äther und 100 ml Petroläther (Kp. 40-60 °C). Den Ansatz ließ man über Nacht bei +5 °C stehen. Dabei setzten sich harzartige Bestandteile als Bodensatz ab. Der Überstand enthielt in feiner Verteilung eine weiße Fällung, die durch Abnutschen aus der Suspension entfernt und

---

+) Herrn Dr. STEINBACH vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg danke ich für die Aufnahme der Spektren.

auf einem Filter gesammelt wurde. Nach mehrmaligem Waschen mit eisgekühltem Petroläther trocknete man den Niederschlag bei Raumtemperatur. Es resultierten 2,05 g (= 1,4 % der Droge) cremefarbenes, bitteres Pulver (="Rohgemisch") mit einer Schmelztemperatur von 145 - 149 °C.

Das Rohgemisch wurde durch präparative DC weiter gereinigt (zweifache Entwicklung im System 11a; vgl. 9.3.3.3.). Man erhielt in 38proz. Ausbeute Elaterinid und in 3proz. Ausbeute Desacetyl-Elaterinid (jeweils bezogen auf "Rohgemisch"). - Elaterinid wurde darüberhinaus noch durch Chromatographie mit der Trockensäulentechnik in 0,025proz. Ausbeute (Bezug auf Droge; Einsatz 15 g) gewonnen (SC 2; siehe 9.3.3.4.).

a) Elaterinid (MG 718)

Schmelztemp.: 162 °C; $[\alpha]_D^{20} = -61^\circ$ (Chloroform, c = 0,31)

$= -46^\circ$ (Äthanol, c = 0,31)

UV-Spektrum (in Äthanol):

$\lambda_{max.} = 234$ nm

$\varepsilon = 12060$; $\log \varepsilon = 4.08$

IR-Spektrum:

$\tilde{\nu}\,[cm^{-1}]$ 3450 (OH), 1730 (OAc), 1690 (3-, 11-, 22-keto), 1635 (C=C), 1265 (OAc), 1080 (C-O)

Massenspektren:

FD: 741 (M + 23)

FI: m/e (% rel. Intens.)

526 (78), 226 (59), 220 (89), 182 (56), 157 (BP), 56 (74), 42 (53).

509 (22), 415 (39), 414 (47), 391 (28), 283 (32), 279 (52), 278 (39), 101 (27), 61 (25), 60 (BP).

399 (38), 86 (BP), 60 (90).

365 (11), 133 (14), 60 (BP), 50 (25), 42 (23).

b) Desacetyl-Elaterinid (MG 676)

$[\alpha]_D^{20} = -47^\circ$ (Methanol, c = 0,22)

UV-Spektrum (in Methanol):

$\lambda_{max.}$ = 234 nm

ε = 9730; log ε = 3.87

IR-Spektrum:

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] 3350 (OH), 1680 (3-, 11-, 22-keto), 1630 (C=C), 1070 (C-O).

FD-Massenspektren: 1028 (Aglykon-Aglykon)

681 (M + 23 - 1 H_2O)

9.5. Analyse einzelner Säulenfraktionen

9.5.1. "Glykosid a" (Desacetyl-Elaterinid)

Aus 2 g Eindampfrückstand der Fraktionen 58 - 92 (SC 5; siehe 9.3.3.4.) erhielt man durch Lösen in Äthanol und Zugabe von Chloroform, Äther und Petroläther in 12proz. Ausbeute eine hellgelbe Fällung, die durch präparative DC (siehe 9.3.3.3.) im System XI weiter gereinigt wurde. Es resultierten 10 mg von "Glykosid a", die aus Äthanol-Chloroform in feinen Plättchen ausfielen. "Glykosid a" entsprach in allen Punkten Desacetyl-Elaterinid aus Koloquinthen (siehe 9.4.) und war chromatographisch mit dem Desacetylierungsprodukt (siehe 9.3.5.) von Elaterinid identisch.

9.5.2. "Glykosid b" (Cucurbitacin L-Glucosid)

Als Nebenprodukt bei der unter 9.5.1. beschriebenen Isolierung von "Glykosid a" fielen 2 mg amorphes "Glykosid b" an. Nach enzymatischer Spaltung (siehe 9.3.4.) konnten chromatographisch Cucurbitacin L und Glucose nachgewiesen werden.

9.5.3. "Fraktionen 93 - 104"

Im gelb-braunen Fraktionsrückstand (1 g) der Fraktionen 93 - 104 (SC 5; siehe 9.3.3.4.), welcher einen zuerst brennenden, dann intensiv bitteren Geschmack aufwies, wurden zwei Glykoside nachgewiesen, die mit dem Reagenz nach LIEBERMANN-

BURCHARD (siehe 9.3.3.1.) positiv reagierten. Nach enzymatischer Spaltung konnte man Glucose chromatographisch nachweisen. Ebenso wie die Glucoside enthielten auch die Aglyka nach 9.3.5. acetylierbare Hydroxylgruppen.

a) $FeCl_3$-negatives Aglykon:
R_f = 0,17 (System I); 0,52 (System III); 0,3 (System IX).
acetyliert: R_f = 0,57 (System IX; zum Vergleich: Acetyl-Cuc. A R_f = 0,74).

b) $FeCl_3$-positives Aglykon:
R_f = 0,1 (System I); 0,43 (System III); 0 (System IX).
acetyliert: R_f = 0,78 (System IX).

UV-Spektrum (in Methanol):
$\lambda_{max.}$ = 230 (sh), 275, 310 (sh)

Charakteristische Verschiebungen auf Zusatz komplexbildender und alkalisierender Reagenzien: siehe Tab. 7, Seite 92.

9.5.4. "F 25"

Die Fraktionen 25 und 26 (SC 5; siehe 9.3.3.4.) ergaben nach dem Eindampfen insgesamt 241 mg eines gelben Öls. Nach mehrwöchigem Stehenlassen kristallisierten grobe weiße Kristalle (siehe Abb. 32, Seite 93) aus, die durch Waschen mit Aceton und Äthylacetat und mehrfachem Umkristallisieren aus Chloroform-Methanol-Mischungen von anhaftendem zähem Öl ge-

reinigt wurden. Es resultierten 10 mg chromatographisch einheitliche Substanz "F 25" ("Kalkprobe" auf Stickstoff nach FEIGL 1960: positiv; DRAGENDORFF: negativ; KEDDE: positiv).

Schmelzpunkt: 191 °C

UV-Spektrum (in Methanol):

$\lambda_{max.}$ ($\varepsilon_{\%}$) = 208 nm (400), 220 sh (200), 275 (40), 282 sh.

IR-Spektrum:

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] 3220, 3140, (3040), (3020), 2960, (2820), 1710, 1690, 1680, 1470, 1290, 1100, 1050, 1010, 890, 830, 810, 660.

Massenspektren:

FD: verschieden; reproduzierbare höchste Masse 250.

EI: a) 70 eV (210 °C)

m/e (% rel. Intens.) 166 (2), 140 (5), 112 (1), 111 (1), 101 (2), 99 (2), 98 (2), 85 (8), 84 (BP), 83 (6), 82 (1), 73 (1), 58 (1), 57 (9), 56 (10), 55 (7), 54 (5), 46 (3), 45 (1), 44 (3), 43 (1), 42 (1), 41 (17), 39 (2), 30 (3).

b) 38 eV (150 °C)

m/e (% rel. Intens.) 140 (2), 102 (2), 101 (10), 100 (2), 98 (3), 85 (15), 84 (BP), 83 (18), 73 (2), 58 (7), 57 (17), 56 (8), 55 (5), 46 (7), 43 (1).

c) 12 eV

m/e (% rel. Intens.) 140 (70), 84 (BP), 83 (52).

9.6. Methoden der Gehaltsbestimmung

9.6.1. Probenvorbereitung

12,5 g frisches Kraut (mit der Schere in etwa 1 cm lange Stücke zerschnitten) bzw. 3,0 g getrocknete und gepulverte Droge werden mit 100 ml heißem Äthanol übergossen und 10 Minuten unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Danach wird abgepreßt und der Drogenrückstand im Mörser zerstampft. Drogenrückstand und Filter werden noch 2mal mit je 100 ml 70%igem Äthanol ausgekocht.

Die vereinten filtrierten Auszüge engt man unter vermindertem Druck bei 50 °C Badtemperatur auf ca. 50 ml ein und versetzt mit 50 ml einer 20%igen Lösung von neutralem Bleiacetat. Der entstandene Niederschlag wird abzentrifugiert, 2mal mit je 10 ml Äthanol-Wasser (1+1) gewaschen, der Überstand mit 50 ml einer 15%igen Lösung von $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$ versetzt und der entstehende Niederschlag erneut abzentrifugiert und 2mal mit je 10 ml Äthanol-Wasser (1+1) gewaschen.

Die vereinigten Filtrate bzw. Überstände werden 4mal mit je 10 ml Chloroform-Äthanol (3+1) ausgeschüttelt (= E_Q I), darauf noch 4mal mit je 10 ml Chloroform-Isopropanol (3+2) und nach Sättigung der wäßrigen Phase mit 3 g $Na_2SO_4 \cdot 10\ H_2O$ ebenfalls noch 4mal mit je 10 ml Chloroform-Isopropanol (3+2) (= E_Q II).

Die organischen Phasen trocknet man über wasserfreiem Natriumsulfat, filtriert unter Nachwaschen des Filters und engt die Filtrate unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer zur Trockne ein.

Die Trockenrückstände E_Q I und E_Q II überführt man quantitativ mit Chloroform-Methanol (1+1) in einen Meßkolben und füllt auf 5,00 ml auf (= Stammlösung).

Diese Stammlösungen dienen zur DC und anschließenden Remissionsmessung nach 9.6.3. (2 µl Stammlösung entsprechen 5 mg Frischmaterial bzw. 1,2 mg Droge).

Zur Bestimmung der Cucurbitacine in Extrakten werden diese in geeigneten Konzentrationen in Chloroform-Methanol (1+1) gelöst.

Bei der Extraktion der Wurzel- und Rhizomdroge wird auf die Bleifällung verzichtet. Stattdessen versetzt man mit 100 ml Wasser. Weitere Aufarbeitung wie oben.

Zartes Material, wie die aus Gewebekulturen regenerierten Sprosse mit anhaftenden Kalli, extrahiert man mit der zehnfachen Menge an 70%igem Äthanol unter Verwendung eines Ultra-Turrax. Die Extraktionslösung wird unter Nachwaschen in einen Rundkolben filtriert und unter vermindertem Druck zur Trockne gebracht. Den Rückstand nimmt man mit Chloroform-Methanol (1+1) auf. 2 µl der so erhaltenen Stammlösungen entsprachen etwa 50 mg Frischmaterial (= junge Sprosse und Kalli).

9.6.2. Gesamtglykosidbestimmung mit BALJET-Reagenz

Die Bestimmung erfolgte nach der bei WICHTL (1971) angegebenen Vorschrift:

Etwa 20 mg E I und 50 mg E II (genau gewogen) wurden in jeweils 50,00 ml Methanol aufgenommen. 2,00 ml der methanolischen Lösung mischte man in einem Schliffreagenzglas mit 2,00 ml BALJET-Reagenz (95,0 ml 1%ige Pikrinsäurelösung + 5,0 ml 10%ige Natronlauge) und bestimmte nach 20 Minuten die Extinktion der erhaltenen Farblösung bei 494 nm (d = 1 cm) gegen den Leerwert (BALJET-Reagenz).

Der Gehalt errechnet sich nach

$$\mu g \text{ Glykoside} = E \cdot f$$

($f_{Digitoxin}$ für 4,00 ml Farblösung = 175).

Es ergaben sich fiktive Werte von 3,3 % (E I) bzw. 1,7 % (E II) Gesamtglykoside, jeweils berechnet als Digitoxin.

9.6.3. Quantitative DC der Cucurbitacine

a) Substanzen, Konzentrationen, Lösungen und Auftragesystem

Glykosidstammlösungen nach 9.6.1., Verdünnungen 1:5 und 1:10. Ermittlung der geeigneten Verdünnung jeweils in einem Vorversuch.

Eichlösungen:

2 µl enthielten etwa 1, 0,5 und 0,2 µg Cucurbitacin E,
1,5, 0,75 und 0,375 µg Cucurbitacin I und
3, 1,5 und 0,75 µg Elaterinid.

Auftragesystem:

2 µl MICROCAPS der Firma DRUMMOND SCIENTIFIC COMPANY, U.S.A., SHANDON Labortechnik, Frankfurt/Main.

b) Chromatographische Parameter

DC-Platten:

Kieselgel 60 F_{254}-Fertigplatten der Firma MERCK, Darmstadt.

Die Startlinie liegt bei allen Chromatogrammen 2 cm vom unteren Rand entfernt, der Abstand der Einzelauftragungen untereinander beträgt 2,3 cm nach folgendem Auftrageschema (HEROLD 1975):

$$E_1\ E_1\ E_2\ A\ A\ E_2\ E_3\ E_3$$

Hierin steht E für Eichlösung, A für Analysenlösung.
Bei Verwendung einmal erstellter Eichgeraden:
Auftrageschema entsprechend, mit Verdünnungen der Analysenlösungen.

Fließmittelsysteme:

Die Komponenten der Fließmittelsysteme besitzen p.a. - Qualität; die Entwicklung erfolgt in mit Fließpapier U-förmig ausgekleideten N-Kammern bei Raumtemperatur, aufsteigend, jeweils nur eine Platte (unter Verwendung von KS-Rillenklammern der Firma DESAGA).

Zur gleichzeitigen Bestimmung von Aglyka und Glykosiden fand System III Verwendung.

c) Densitometerdaten

SCHOEFFEL SD 3000 Densitometer mit PHILIPS PM 8000 Schreiber.
Monochromatoreintrittsspalt: 2 mm, Spalt: 10 mm x 10 mm
Lichtquelle: Hg/Xe, Tischvorschub: 50 mm/min.
Remission: Meßwellenlänge 230 nm.

d) Auswertung

Die Auswertung der aufgezeichneten Remissionsortskurven erfolgte über die jeweiligen Peakhöhen.

9.6.4. Indirekte spektralphotometrische Bestimmung von Gratiosid

2,00 ml der Stammlösung von E_Q II (siehe 9.6.1.) dampft man unter vermindertem Druck bei max. 50 °C zur Trockne ein. Den Rückstand nimmt man in 0,20 ml Chloroform-Methanol (1+1) auf. Von dieser Lösung werden 10 µl, 20 µl, 30 µl und 40 µl auf selbstgestrichenen, frisch aktivierten Kieselgel GF_{254}-Platten (0,25 mm) strichförmig in 1 cm breiten Bändern aufgetragen. In gleicher Weise verfährt man mit 10 µl, 20 µl und 30 µl der Standardlösung (5-10 mg Gratiosid in 2,00 ml Chloroform-Methanol). Eine Bahn bleibt für die Bestimmung des Leerwertes frei. Die Entwicklung erfolgt über eine Laufstrecke von 12 - 15 cm im System IV.

Nach der Entwicklung werden die Platten an der Luft getrocknet und dann kurz (zur Sichtbarmachung der Flecken) in einer Kammer Joddämpfen ausgesetzt. Die dem Gratiosid entsprechenden Zonen lokalisiert man anhand der Vergleichsbahnen und markiert die Größe der Flecken. Zur Entfernung des Jods werden die Platten anschließend 5 Minuten bei 100 °C erhitzt.

Danach kratzt man die markierten Substanzflecken aus und überführt sie in geeignete Zentrifugengläser.

Nach Zugabe von 3,00 ml WASICKY's Reagenz (Lösung von 0,3 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd in 100 ml einer Mischung aus 44 ml Wasser und 56 ml konz. Schwefelsäure) beläßt man unter häufigem Schütteln 10 Minuten bei 60 °C und zentrifugiert sodann 5 Minuten bei ca. 6000 U/min. 35 Minuten nach der Reagenzzugabe werden die Extinktionen der klaren, blaß-violetten Lösungen bei 520 nm gegen den Leerwert gemessen.

9.7. Messung der Elaterase-Aktivität in Frischpflanzen

Für jede Bestimmung wurden 2 Pflanzen von verschiedenen Stellen des Feldes zufällig, aber repräsentativ für den Entwicklungszustand des überwiegenden Teils der Pflanzen, geerntet und sofort zerkleinert, auf das 10fache ihres Gewichtes mit Wasser aufgefüllt und mit dem Ultra-Turrax unter Kühlung homogenisiert. Nach Filtration durch einen kleinen Wattebausch wurde 10 Minuten bei 5000 - 6000 U/min zentrifugiert.

1,00 ml der überstehenden klaren Lösung wurde mit 1,00 ml Elaterinid-Standardlösung versetzt, kurz umgeschüttelt und die entstehende Trübung mittels eines Photometers mit angeschlossenem Schreiber [+)] als Funktion der Zeit aufgezeichnet. Als Vergleich diente eine Mischung aus gleichen Teilen Preßsaft und Wasser.

Temperatur: 25 ± 3 °C

Wellenlänge: 560 nm

Papiervorschub: 5 mm/min

Herstellung der Elaterinid-Standardlösung:

25 mg Elaterinid wurden in wenig 96%igem Äthanol (DAB 7) angelöst und mit Wasser in einem Meßkolben auf 50,00 ml aufgefüllt.

Bestimmt wurde die Elaterase-Aktivität des Gratiola-Saftes durch Messung der Zeit t, in der die Hälfte der maximalen Trübung erreicht wurde (modifiziert nach REHM 1960). Der Grad der Trübung ist proportional der Menge des ausgefallenen Aglykons. Zahlenmäßig wird die Elaterase-Aktivität ausgedrückt als

$$\frac{1}{t \cdot \text{min}} \times 100.$$

+) s. 9.3.7., S. 195

9.8. Methoden der pharmakologischen Untersuchung

a) Tiermaterial

Die Versuche wurden an isolierten Herzen weiblicher Meerschweinchen der Gewichtsklassen 300 g und 500 g [1] durchgeführt.

Zunächst sind die Tiere über mehrere Tage beobachtet und ihre Gewichtsveränderungen aufgezeichnet worden. Zu den Versuchen haben wir nur die Herzen solcher Meerschweinchen verwendet, deren Gewicht stetig zunahm und die einen lebhaften und gesunden Eindruck machten.

Die Unterbringung erfolgte in Makrolon-Käfigen (55 x 33 cm) [2]. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter (Altromin-Meerschweinchendiät [3] und Wasser.

Die Zuteilung der Tiere eines Kollektivs (20 Stück) zu Versuchen und Kontrollen geschah mit Hilfe von Zufallstabellen.

b) Versuchsvorbereitung

Das Meerschweinchen wird durch Genickbruch getötet und sofort aus den Halsschlagadern entblutet. Nach Eröffnen des Brustraumes wird der Herzbeutel entfernt und das Herz mit dem Arcus aortae entnommen. Die weitere Präparation erfolgt in Carbogen-

---

1) Fa. Ivanovas, Kisslegg/Allg.
2) Süsse u. Schmidt KG, Kassel
3) Altromin GmbH, Lage (Lippe)

gesättigter Tyrodelösung (s. unter d). Dabei hat es sich als günstig erwiesen, die Lösung vorher auf etwa +10 °C abzukühlen. Zur Vermeidung von Thrombenbildungen wird das Herz in der gekühlten Tyrodelösung durch leichten Druck zur Entleerung des Restblutes veranlaßt. Die Aorta wird freipräpariert, dicht vor dem Abgang des ersten Gefäßes durchgetrennt und die luftblasenfrei mit Tyrodelösung gefüllte Kanüle eingebunden ohne dabei die Aortenklappen zu durchstoßen. Nach Aufschneiden der

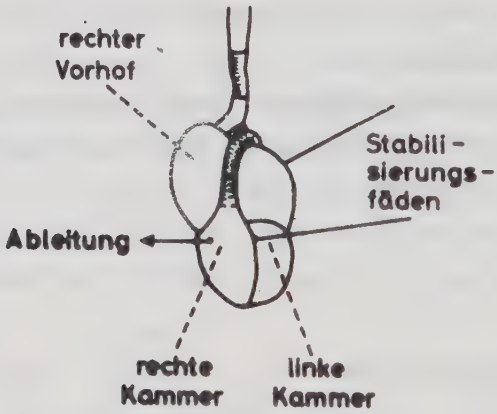


Abb.57 : Transversale Registrierung der Kontraktionskraft des isoliert perfundierten Meerschweinchenherzens (nach BECKETT 1970, modif.)

Arteria pulmonalis befestigt man das Herz an der Perfusionsapparatur, wobei die rechte Kammerwand in Richtung des DMS-Aufnehmers (DMS = Dehnungsmeßstreifen) zeigt. Zur Fixierung des Herzens befestigt man an der linken Kammerwand nahe dem

Septum, etwa in der Mitte zwischen Herzbasis und -spitze, beiderseits mittels eines Häkchens je einen Stabilisierungsfaden, wobei keine Koronargefäße beschädigt werden dürfen (Abb.57). Die Fäden sind an beweglichen Halterungen angeschlungen, die ihrerseits an einer zum Herzen horizontal verlaufenden festen Stange angebracht sind (Abb.58).

Zur Registrierung der Kontraktionskraft wird ein dritter Faden, der mit dem DMS-Aufnehmer verbunden ist, in der Mitte der rechten Kammerwand befestigt, ebenfalls mit Hilfe eines Häkchens.

Durch den Feintrieb des DMS-Aufnehmers und die beweglichen Fixierungshalterungen wird die jeweils günstigste Vorspannung der Herzen eingestellt. Diese liegt im Durchschnitt bei einem bis drei Gramm.

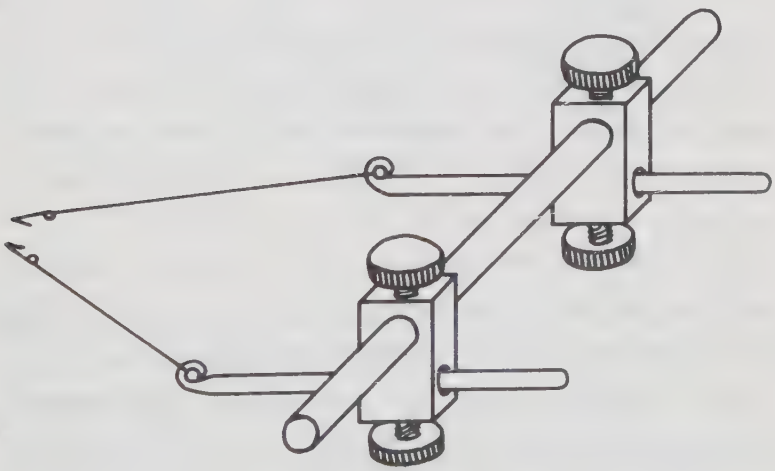


Abb.58 : Halterung zur Befestigung der Stabilisierungsfäden

Etwa fünfzehn bis zwanzig Minuten nach dem Anhängen des Präparates an die Perfusionsapparatur kann mit der Perfusion der pharmakonhaltigen Tyrodelösung begonnen werden.

c) Prinzip der Methode und Registrierung

Das isolierte Meerschweinchenherz wird von der Aorta her perfundiert. Da auf den Aortenklappen ein Druck von etwa 6000 Pa lastet, bleiben diese geschlossen und das Perfusionsmedium fließt ausschließlich durch die Koronargefäße in den rechten Vorhof. Daher kann man die aus der Vena cava inferior austretende Flüssigkeitsmenge als Maß für den Koronardurchfluß ansehen. Die Registrierung erfolgt durch Unterstellen eines mit einem Trichter versehenen Meßzylinders, in dem die pro Minute ablaufende Flüssigkeit aufgefangen wird.

Die Perfusionsapparatur (Abb. 59) besteht aus zwei über einen Vierwegehahn verbundenen doppelwandigen Glasröhren, aus denen wahlweise Tyrodelösung oder pharmakon-haltige Nährlösung dem Herzen zufließen kann. Zwischen Mantel und innerer Röhre zirkuliert durch einen Umlaufthermostaten erwärmtes Wasser, welches die Lösungen in beiden Röhren gleichermaßen auf einer konstanten Temperatur um 36 ^{o}C hält.

Die Anschlußstutzen am unteren Ende der beiden Röhren ermöglichen die Zufuhr von Carbogen (95 % O_2 + 5 % CO_2), welches über feinmaschige Glasfritten die Lösungen durchperlt.

Der Vierwegehahn (Abb. 59) erlaubt es, die Flüssigkeit aus einer Röhre in das Herz und gleichzeitig die Lösung aus der anderen Röhre nach außen abzuleiten. Dies ist notwendig,

Abb. 59

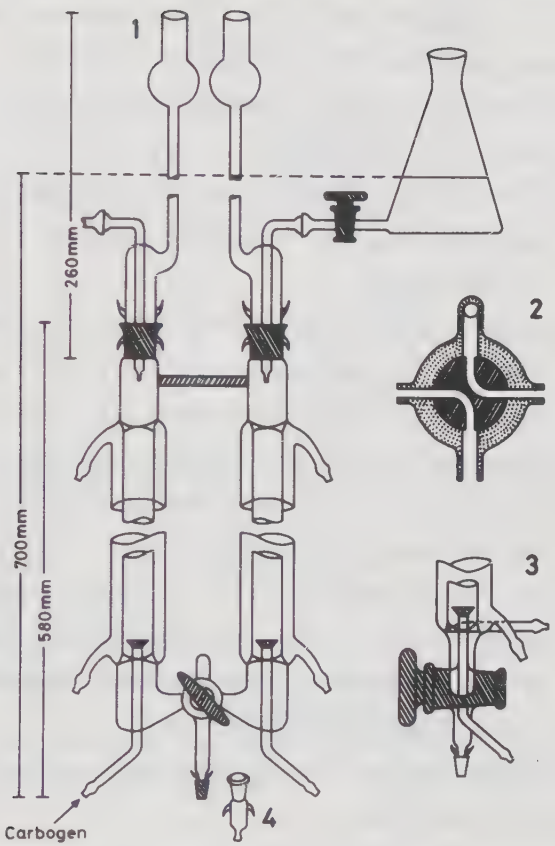


Abb. 59: Apparatur zur Perfusion des isolierten Meerschweinchenherzens

1 Apparatur
2 Vierwegehahn
3 Seitenansicht des Vierwegehahns mit Abflußmöglichkeit zur Entnahme von Perfusionslösung
4 Kanüle

damit man einige Minuten vor dem Umschalten von der einen auf die andere Röhre den Abfluß aus beiden einander angleichen kann, um die Lösungen auf gleiche Temperatur und Gassättigung zu bringen. Auf diese Weise lassen sich Artefakte in der Registrierung nach dem Umschalten weitgehend vermeiden.

Gegenüber der bei KUSCHINSKY u. Mitarb. (1974) beschriebenen Apparatur nahmen wir geringfügige Änderungen vor, die eine bessere Konstanthaltung des Flüssigkeitsspiegels und des Auslaufs zum Ziel hatten.

Die Registrierung der Kontraktionskraft des perfundierten Herzens erfolgte mit der "transversalen" Ableitung (s. Abb. 57) nach BECKETT (1970). - Durch Fixierung der linken Kammer mit zwei Stabilisierungsfäden wird jegliche Rotationsbewegung des Herzens verhindert, die zu einer Überlagerung von Signalen bei der Registrierung führen würde.

Über den dritten Faden (s. Abb. 57) wird die Kraftentwicklung einem DMS-Aufnehmer (Abb. 60) zugeleitet, dessen Meßsignale verstärkt und über einen Schreiber sichtbar gemacht werden ("isometrische" Registrierung).

Die Kontraktionskraft in g ergibt sich aus der Amplitude des Schreiberausschlages.

Der Koronardurchfluß in ml/min wird durch Unterstellen eines Meßzylinders gemessen (Stoppuhr).

Die Feststellung der Herzfrequenz (Schläge pro Minute = $^{b}/_{min}$) erfolgt durch Mitzählen der Kontraktionen oder nachträglich durch Auszählen der Schwingungen, die bei stark erhöhter Papiervorschubgeschwindigkeit des Schreibers aufgezeichnet wurden.

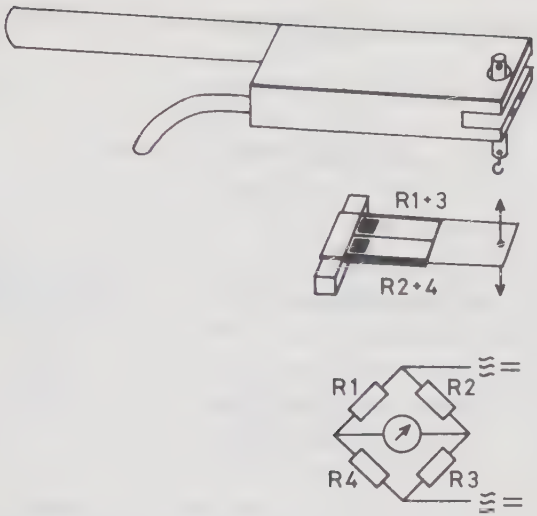


Abb. 60 : DMS-Aufnehmer TF3V20 (Bestell-Nr. 700 000 00) +)

TF Trägerfrequenz 5 kHz
3V 3 Volt, max. 4 Volt Speisespannung
20 max. Belastung in g
Vollbrücke mit 4 x 120 Ohm

Außerdem wurden zur Registrierung benötigt:
Vorverstärker TF No. 226 (Bestell-Nr. 20604801) +)
in entsprechendem Einsatzrahmen mit Versorgungsteil +)
Schreiber: PERKIN-ELMER Recorder 56

+) Fa. HELLIGE, Freiburg

d) Herstellung der Perfusionslösungen

Tyrode - Lösung (KUSCHINSKY u. Mitarb. 1974)

Tab. 16 : Zusammensetzung der Tyrode - Lösung

Ion	Na^+	K^+	Ca^{++}	Mg^{++}	Cl^-	HCO_3^-	$H_2PO_4^-$	Glucose
mÄq/l	149,3	2,7	3,6	2,1	145,4	11,9	0,4	1,0 g/l

pH-Wert der mit Carbogen begasten Lösung (37 °C): 7,4

Da Tyrodelösung selbst schlecht haltbar ist, wurden haltbare konzentrierte Salzlösungen (= Stammlösungen) hergestellt und bei Bedarf verdünnt.

Um beim Zusammengeben der Stammlösungen das Ausfallen von Carbonaten und Phosphaten zu vermeiden, wird zuerst das gesamte zur Verdünnung benötigte Wasser in den Mischzylinder gegeben und dann erst die Stammlösungen in der angegebenen Reihenfolge (I-III) zugesetzt, wobei nach Zugabe jeder Stammlösung gut umzuschütteln ist.

Zusammensetzung der Stammlösungen:

Stammlösung I :	Natriumchlorid	200,0 g
	Kaliumchlorid	5,0 g
	Calciumchlorid	5,0 g
	Magnesiumchlorid	2,5 g
	Wasser ad	1000,0 ml
Stammlösung II :	Natriumhydrogencarbonat	50,0 g
	Wasser ad	1000,0 ml
Stammlösung III :	Natriumdihydrogenphosphat-2-hydrat	6,48 g
	Wasser ad	1000,0 ml

Für 1 l fertige Tyrodelösung werden benötigt:

Stammlösung I	40 ml
Stammlösung II	20 ml
Stammlösung III	10 ml
Glucose	1 g
Wasser ad	1000 ml

Test - Lösungen

Diese wurden generell in solchen Konzentrationen angesetzt, daß entsprechende Verdünnungen daraus ausreichend genau hergestellt werden konnten. Meistens ließ es sich nicht vermeiden, die Lösungen mit einem Zusatz von Äthanol herzustellen. In diesen Fällen gingen wir so vor, daß die Substanz in möglichst wenig Äthanol 96 % (DAB 7) gelöst und dann unter häufigem

Umschütteln mit Wasser (bidest.) verdünnt wurde. Es wurde aber beachtet, daß die endliche Alkoholkonzentration im Perfusionsmedium ein Promille nicht überstieg.

Von diesen konzentrierten Lösungen, deren Aufbewahrung im Kühlschrank (+ 4 °C) erfolgte, mischten wir 0,01 - 1 ml mit 1 l Tyrodelösung. War es ausnahmsweise notwendig, größere Mengen an Stamm-Testlösung zuzusetzen, wurde diese statt mit Wasser mit Tyrodelösung angesetzt und alsbald verbraucht.

Beim Einsatz alkoholhaltiger Tinkturen oder Perkolate gingen wir so vor, daß wir die Zubereitung mit einem aliquoten Teil der gewünschten Verdünnung an Tyrodelösung versetzten, den Alkohol am Rotationsverdampfer soweit wie möglich entfernten und mit Tyrodelösung auf die Endkonzentration auffüllten. Dieser Weg war in der Regel eher gangbar, als die Tinktur einzudampfen und den Rückstand in der oben beschriebenen Weise wieder in Lösung zu bringen.

10. Literaturverzeichnis

ALEXA, E. u. P. JITARIU: Extras din Revista Stiintifica "V. Adamachi" (Jassy) 35, Nr. 1-2 (1949)

ANDERSON, L.A., N.S. DOGGETT u. M.S.F. ROSS: Planta medica 32, 125 (1977)

ARENDS, J.: Volkstümliche Namen der Arzneimittel, Drogen, Heilkräuter und Chemikalien, 16. Aufl., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1971

AUDIER, H.E. u. B.C. DAS: Tetrahedron Letters 20, 2205 (1966)

BAUMGARTEN, G.: Die herzwirksamen Glykoside, VEB Georg Thieme, Leipzig 1963

BAUMGARTNER, E., U. BOFFO, T. GÜNTERT, H. HANDSCHIN, E. HAUSER, H.H.A. LINDE, M. RAGAB, L. SAWLEWICZ, S. SPENGEL u. A. TANNER: Pharm. Acta Helv. 49, 31 (1974)

BECKETT, P.R.: J. Pharm. Pharmac. 22, 818 (1970)

BELLAMY, L.J.: Ultrarot-Spektrum und chemische Konstitution, 2. Aufl., Dr. Dietrich Steinkopff Verlag, Darmstadt 1966

BENTHE, H.F.: in H. JAHRMÄRKER (Hrsg), Digitalistherapie - Beiträge zur Pharmakologie und Klinik, S. 31; Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1975

BERGER, F.: Handbuch der Drogenkunde Bd. 4, Verlag für medizinische Wissenschaften Wilhelm Maudrich, Wien 1954

BIEMANN, K.: Mass spectrometry of selected natural products; in ZECHMEISTER (Hrsg.), Fortschr. Chem. Org. Naturst. 24, 1 (1966)

BOERNER, F.: Taschenwörterbuch der botanischen Pflanzennamen, 2. Aufl., Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg 1966

BOHINC, P. u. J. KORBAR-SMID: Farmacevtski vestnik (Ljubljana) 20, 155 (1969)

BORODIN, L.I. u. A.V. DEGOT: Khim. Prir. Soedin. 5, 432 (1969); ref. in C.A. 72, 75655 (1970)

BORODIN, L.I., V.I. LITVINENKO u. H.V. KURINNAYA: Farm. Zh. (Kiev) 25, 62 (1970); ref. in C.A. 73, 120453 (1970)

BORODIN, L.I. u. H.V. KURINNAYA: Rast. Resur. 6, 411 (1970); ref. in C.A. 74, 61609 (1971)

BOSSHARDT, H., A. GUGGISBERG, S. JOHNE, H.-J. VEITH, M. HESSE u. H. SCHMID: Pharm. Acta Helv. 51, 371 (1976)

BROWN, P., F. BRUSCHWEILER, G.R. PETTIT u. T. REICHSTEIN: J. Am. Chem. Soc. 92, 4470 (1970)

BUDZIKIEWICZ, H.: Massenspektrometrie, Verlag Chemie, Weinheim 1972

BUDZIKIEWICZ, H., C. DJERASSI u. D.H. WILLIAMS: Structure elucidation of natural products by mass spectrometry, Vol. I: Alkaloids, San Francisco 1964

CHAMBLISS, O.L. u. C.M. JONES: Science 153, 1392 (1966)

CHANG, D.J., S.K. WAHBA KHALIL, L.J. SCHERMEISTER: Planta medica 20, 324 (1971)

DARWISH-SAYED, M., S.I. BALBAA, M.S. AFIFI: Planta medica 26, 293 (1974)

DREYER, D.L. u. E.K. TROUSDALE: Phytochemistry 17, 325 (1978)

DUNCAN, G.R., D.D. LEVI u. R. PYTTEL: Planta medica 16, 224 (1968)

EDERY, H., G. SCHATZBERG-PORATH, S. GITTER: Arch. int. pharmacodyn. 130, 315 (1961)

ENSLIN, P.R. u. S. REHM: Hoppe-Seylers Zeitschrift f. physiol. Chemie 303, 97 (1956)

Ergänzungsbuch zum Deutschen Arzneibuch, 6. Ausgabe (Erg.-B. 6, 1938), Neudruck, Deutscher Apotheker-Verlag, Stuttgart 1953

FEIGL, F.: Tüpfelanalyse, Bd. II Organischer Teil, 4. Aufl., Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt/Main 1960

FLÜCK, H.: Unsere Heilpflanzen, 5. Ausg., Ott Verlag, Thun 1974

FOZARD, J.R. u. E. MUSCHOLL: Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. 270, 319 (1971)

FUCHS, L., M. WICHTL u. H. JACHS: Arch. Pharm. 293, 414 (1960)

GAILIS, L. u. M. VERDY: Can. J. Biochem. 49, 227 (1971)

GARCKE, A.: Illustrierte Flora, 23. Aufl., Hrsg. K. v. WEIHE, Verlag Paul Parey, Berlin u. Hamburg 1972

GESSNER, O., G. ORZECHOWSKI (Hrsg.): Gift- und Arzneipflanzen von Mitteleuropa, 3. Aufl., Carl Winter, Universitätsverlag, Heidelberg 1974

GMELIN, R.: Arzneim.-Forsch. 13, 771 (1963)

GMELIN, R.: Arzneim.-Forsch. 14, 1021 (1964)

GMELIN, R.: Arch. Pharm. 300, 234 (1967)

GÖRLICH, B.: Arzneim.-Forsch. 15, 493 (1965)

GUHA, J. u. S.P. SEN: Nature New Biology 244, 223 (1973)

HARTWELL, J.L.: Lloydia 34, 204 (1971)

HEGI, G.: Flora von Mitteleuropa VI/1, Lfg. 1 u. 2, 2. Aufl., Carl Hauser Verlag, München 1968

HEGNAUER, R.: Pharm. Acta Helv. 28, 354 (1953)

HEGNAUER, R.: Planta medica 19, 138 (1970/71)

HEGNAUER, R.: Chemotaxonomie der Pflanzen Bd. 6, Birkhäuser Verlag, Basel u. Stuttgart 1973

HEMPHILL, D.D., L.R. BAKER u. H.M. SELL: Can. J. Biochem. 51, 1647 (1973)

HEROLD, G.: Neue Auswertemethoden in der quantitativen Dünnschichtchromatographie, Dissertation Marburg 1975

HERRMANN, K.: Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 165, 87 (1977)

HESSE, M.: Alkaloidchemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1978

HOHMANN, H.: Untersuchungen über das Vorkommen von Saponinen bei den Scrophulariaceen, Dissertation TH Braunschweig 1936; zit. nach HEGNAUER 1973

Homöopathisches Arzneibuch, 3. Aufl., 4. Neudruck, Verlag Dr. Willmar Schwabe; Deutscher Apotheker-Verlag, Stuttgart 1958

HOPPE, H.A.: Drogenkunde Bd. 1, 8. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin, New York 1975

HYLANDS, P.J. u. A.M. SALAMA: Phytochemistry 15, 559 (1976)

JARETZKY, R.: Arch. Pharm. 273, 334 (1935)

JENSEN, K.B.: Acta pharmacol. toxicol. 9, 99 (1953)

JEREMIAS, K.: Über die jahresperiodisch bedingten Veränderungen der Ablagerungsform der Kohlehydrate in vegetativen Pflanzenteilen mit besonderer Berücksichtigung der Zucker der Raffinose-Gruppe; Botanische Studien, Heft 15, VEB G. Fischer, Jena 1964; zit. nach HEGNAUER 1973

JITARIU, P. u. E. ALEXA: Extras din Revista Stiintifica "V. Adamachi" (Jassy) 34, Nr. 4 (1948)

JITARIU, P., Gh. BADARAU u. E. ALEXA: Ann. Sc. Université de Jassy 30, 181 u. 185 (1944)

JUNIOR, P.: Die Cardenolidglykoside von Adonis vernalis L. sowie Beiträge zur Analytik entsprechender Kombinationspräparate, Dissertation Marburg 1978

KAISER, F.: Chem. Ber. 88, 556 (1955)

KAISER, R. u. G. GOTTSCHALK: Elementare Tests zur Beurteilung von Meßdaten, B.I.-Hochschultaschenbücher Bd. 774, Bibliographisches Institut, Mannheim/Wien/Zürich 1972

KAKAC, B. u. Z.J. VEJDELEK: Handbuch der photometrischen Analyse organischer Verbindungen Bd. 1 u. 2, Verlag Chemie, Weinheim 1974

KEDDE, D.L.: Pharm. Weekbl. 82, 741 (1947)

KILIANI, H.: Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 234, 273 (1896)

KLYNE, W.: Biochem. J. 41, 47 (1950)

KNAPP, R.: Einführung in die Pflanzensoziologie, S. 29, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart 1971

KOBLITZ, H.: Biol. Zbl. 88, 283 (1969)

KOSCH, A. u. D. AICHELE: Was blüht denn da?, 33. Aufl., Franck'sche Verlagshandlung, Stuttgart 1968

KRAFT, M.: Struktur und Absorptionsspektroskopie der Steroide und Alkaloide, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1975

KRUG, J.: Pharmakognostische Untersuchungen über Gratiola officinalis L., Dissertation TH Braunschweig 1934

KUPCHAN, S.M., H. MESHULAM u. A.T. SNEDEN: Phytochemistry 17, 767 (1978)

KUSCHINSKY, G., R. LINDMAR u. U. WOLLERT: Kurs der Allgemeinen Pharmakologie und Toxikologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1974

KWASNIEWSKI, V.: Dtsch. Apoth. Ztg. 118, 49 (1978)

LAVIE, D. u. E. GLOTTER: The Cucurbitanes, a group of tetracyclic triterpenes; in ZECHMEISTER (Hrsg.), Fortschr. Chem. Org. Naturst. 29, 307 (1971)

LAVIE, D., D. WILLNER u. Z. MERENLENDER: Phytochemistry 3, 51 (1964)

LAWDAY, D.: Nature 170, 415 (1952)

LE MEN, J., P. POTIER, H.-P. HUSSON, P. FORGACS: Ann. Pharm. Franc. 26, 779 (1968)

LIEBENOW, H. u. K. LIEBENOW: Giftpflanzen, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1973

LITVINENKO, V.I., L.I. BORODIN u. H.V. KURINNAYA: Khim. Prir. Soedin. 5, 228 (1969); ref. in C.A. 72, 51803 (1970)

LOEV, B. u. M.M. GOODMAN: Chem. and Ind., 2026 (1967)

LUDEWIG, R. u. K. LOHS: Akute Vergiftungen, 3. Aufl., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1971

MABRY, T.J., K.R. MARKHAM u. M.B. THOMAS: The Systematic Identification of Flavonoids, Springer-Verlag, New York-Heidelberg-Berlin 1970

MACEK, K.: Pharmaceutical applications of thin-layer and paper chromatography, Elsevier Publishing Company, Amsterdam-London-New York 1972

MADAUS, G.: Lehrbuch der biologischen Heilmittel Bd. II, Thieme Verlag, Leipzig 1938; Nachdruck, Georg Olms Verlag, Hildesheim-New York 1976

MANSKE, R.H.F. (Hrsg.): The Alkaloids, Bd. 7 - 16
Academic Press New York, London 1960 - 1977

MARCHAND: Journ. chim. medic. 21, 518 (1845);
zit. nach KRUG 1934

MAURER, K., K. MEIER u. G. REIFF: Ber. dtsch. Chem. Ges.
72, 1870 (1939)

MEYER, K.: Planta medica, Suppl. 4, 1 (1971)

MONTPELLIER: Sur l'herbe des Gratiole, Theses pharmac.
1901 - 1904; zit. nach KRUG 1934

MOSS, G.P.: Planta medica, Suppl. 1966, 87 (1966)

MUTSCHLER, E.: Arzneimittelwirkungen, 3. Aufl., S. 298,
Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft,
Stuttgart 1975

NIELSEN, J.K., L.M. LARSEN u. H. SØRENSEN: Phytochemistry
16, 1519 (1977)

PALEG, L.G.: Ann. Rev. Plant Physiol. 16, 291 (1965)

PESEZ, M.: Ann. Pharm. Franc. 10, 104 (1952)

POHLMANN, J.: Phytochemistry 14, 1587 (1975)

PROME, J.C. u. G. PUZO: Organic Mass Spectrometry 12,
28 (1977)

RAFFAUF, R.F.: A Handbook of Alkaloids and Alkaloid-
Containing Plants, Wiley-Interscience,
New York-London-Sydney-Toronto 1970

RAUH, W. u. K. SENGHAS: SCHMEIL-FITSCHEN: Flora von
Deutschland und seinen angrenzenden Gebie-
ten, 81. Aufl., Quelle u. Meyer, Heidelberg 1968

REHM, S.: Die Bitterstoffe der Cucurbitaceen; in
Ergebnisse der Biologie 22, 108 (1960)

REITER, M.: Arzneim.-Forsch. 17, 1249 (1967)

RETZLAFF, F.: Arch. Pharm. 240, 561 (1902); zit. nach KRUG 1934

ROTHER, A. u. A.E. SCHWARTING: Phytochemistry 17, 305 (1978)

RUBIA, L.B. u. R. GOMEZ: J. Pharm. Sci. 66, 1656 (1977)

SANGSTER, A.W. u. K.L. STUART: Chem. Rev. 65, 69 (1965)

SCHAUENBERG, P. u. F. PARIS: Heilpflanzen, BLV, München-Basel-Wien 1970

SCHEFFER, F. u. R. KIKUTH: Z. Anal. Chem. 191, 116 (1962)

SCHMIDT's Lehrbuch der homöopath. Arzneimittel, 3. Aufl., S. 173, 1952

SCHMIDT-WETTER, R.: Taschenbuch der Pharmakognosie, 3. Aufl., Scherpe Verlag, Krefeld 1972

SCHNEIDER, W.: Lexikon zur Arzneimittelgeschichte Bd. V/2, Govi-Verlag, Pharmazeutischer-Verlag, Frankfurt a. M. 1974

SCHRALL, R.: Untersuchungen zum Wachstum und zur Sekundärstoffproduktion von Kallus- und Suspensionskulturen der Arzneipflanzen Valeriana wallichii, Silybum marianum, Crataegus monogyna u. C. oxyacantha, Ginkgo biloba, Bryonia alba u. B. dioica; Dissertation Heidelberg 1977

SCHULZ, H.: Vorlesungen über Wirkung und Anwendung der deutschen Arzneipflanzen, 4. Aufl. 1907, Neudruck, Karl F. Henig Verlag, Wien 1956

SCOTT, A.I.: Interpretation of the ultraviolet spectra of natural products, Pergamon Press, Oxford-London-Edinburgh-New York,-Paris-Frankfurt 1964

SEIFERT, R.: Süddtsch. Apoth. Ztg. 81, 443 (1941)

SEIFERT. K. u. M.H.A. ELGAMAL: Pharmazie 32, 605 (1977)

SPITELLER, G.: Massenspektrometrische Strukturanalyse organischer Verbindungen, Verlag Chemie, Weinheim 1966

STEINEGGER, E. u. J.H. VAN DER WALT: Pharm. Acta Helv. 36, 599 (1961)

STIEGELE, A.: Hippokrates 25, 21 (1954)

STOLL, A., E. ANKLIGER, F. BARFUSS, W. KUSSMAUL u. J. RENZ: Helv. Chim. Acta 34, 1460 (1951)

TSCHESCHE, R. u. A. HEESCH: Chem. Ber. 85, 1067 (1952)

TSCHESCHE, R., G. BIERNOTH u. G. SNATZKE: Liebigs Ann. Chem. 674, 196 (1964)

TSCHIRSCH, A.: Handbuch der Pharmakognosie I.2 u. III.2, Verlag von Chr. Herm. Tauchnitz, Leipzig 1910 u. 1925

VAUQUELIN: Ann. de chim. 72, 191 (1909); zit. nach KRUG 1934

VYSTRCIL, A. u. Mitarb.: Coll. Czechoslav. Chem. Commun. 24, 3279 (1959); zit. nach HEGNAUER 1973

WALZ, G.F.: Jahrb. f. prakt. Pharmazie, N.F. 18, 1 (1850) und 21, 4 (1852); zit. nach KRUG 1934

WASICKY, R.: Leitfaden für die Pharmakognostischen Untersuchungen im Unterricht und in der Praxis, II. Teil, S. 332, Franz Deuticke, Leipzig u. Wien 1936

WICHTL, M.: Die pharmakognostisch-chemische Analyse, Akademische Verlagsges., Frankfurt/M. 1971

WILLFORT, R.: Gesundheit durch Heilkräuter, 11. Aufl., Rudolf Trauner Verlag, Linz 1971

WILLKOMM, M. u. J. LANGE: Florae Hispanicae Vol. II, Stuttgart 1870

ZIELINSKI, J. u. J. KONOPA: J. Chromatog. 36, 540 (1968)

Lebenslauf

Am 4. Mai 1950 wurde ich als erstes von drei Kindern des techn. Exportkaufmanns Alfred Müller (gest. 1973) und seiner Ehefrau Irmgard, geb. Staab, in Wetzlar geboren.

Von 1955 bis 1960 besuchte ich die Geschwister-Scholl-Schule in Wetzlar-Niedergirmes und anschließend das Goethe-Gymnasium in Wetzlar, an dem ich im Juni 1968 die Reifeprüfung ablegte.

Meine pharmazeutische Ausbildung begann mit einer zweijährigen Praktikantenausbildung in der Haupt-Apotheke in Wetzlar, die ich 1970 mit der Pharmazeutischen Vorprüfung abschloß.

Nach bestandener Zulassungsprüfung nahm ich im Sommersemester 1971 das Studium der Pharmazie an der Philipps-Universität in Marburg auf. Hier legte ich im April 1974 die Pharmazeutische Prüfung ab.

Im Oktober des gleichen Jahres begann ich am Institut für Pharmazeutische Biologie der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Wichtl mit der Arbeit an der vorliegenden Dissertation, die ich im Herbst 1978 zum Abschluß brachte.

Am obengenannten Institut bin ich seit Oktober 1974, zuerst als wissenschaftliche Hilfskraft, dann (ab Januar 1975) als wissenschaftlicher Angestellter, beschäftigt.